

09. 3. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

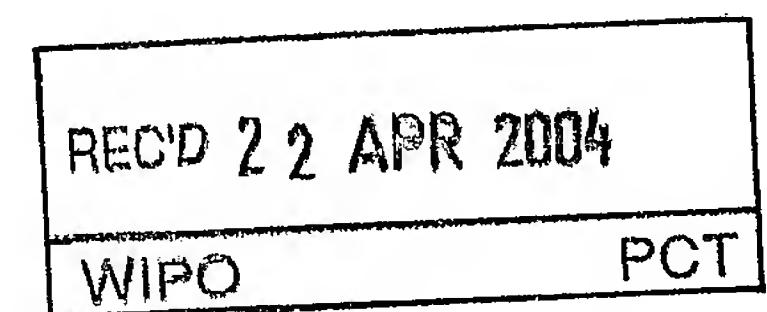
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年12月16日

出願番号
Application Number: 特願2003-418655

[ST. 10/C] : [JP2003-418655]

出願人
Applicant(s): 財団法人くまもとテクノ産業財団

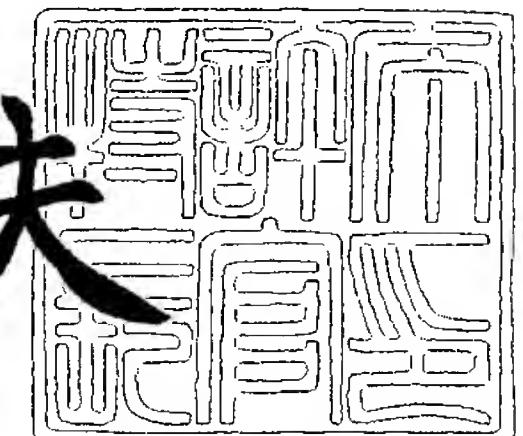


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0180
【提出日】 平成15年12月16日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 16/00
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県熊本市高平 1-30-69
 【氏名】 阪口 薫雄
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県熊本市大江 4-2-30
 【氏名】 桑原 一彦
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県熊本市御領 1丁目 11-55
 【氏名】 萩田 知江美
【特許出願人】
 【識別番号】 801000050
 【氏名又は名称】 財団法人くまもとテクノ産業財団
【代理人】
 【識別番号】 100092783
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 浩
 【電話番号】 03-3273-2611
【選任した代理人】
 【識別番号】 100095360
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 片山 英二
【選任した代理人】
 【識別番号】 100093676
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 純子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120134
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大森 規雄
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 157061
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

HIVのgp120糖タンパク質と結合し、かつ、解離定数がKD=1.0×10⁻⁹ (M)以下の抗体又はその断片。

【請求項 2】

gp120糖タンパク質のうち第308-330番目のアミノ酸配列の少なくとも一部を認識することができる請求項1記載の抗体又はその断片。

【請求項 3】

第308-330番目のアミノ酸配列が配列番号6に示されるものである請求項2記載の抗体又はその断片。

【請求項 4】

ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 5】

請求項4記載の抗体又はその断片のV領域を含む、ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片。

【請求項 6】

配列番号6に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫したGAPNトランスジェニック哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

【請求項 7】

GAPNトランスジェニック動物又はその子孫を、配列番号6に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする、抗HIV抗体又はその断片の製造方法。

【請求項 8】

請求項6記載の細胞とミエローマ細胞との融合細胞を培養し、得られる培養物から抗体を採取することを特徴とする、抗HIV抗体又はその断片の製造方法。

【請求項 9】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片、及び請求項5記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有する医薬組成物。

【請求項 10】

後天性免疫不全症候群の治療薬である請求項9記載の医薬組成物。

【請求項 11】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体若しくはその断片、又は請求項5記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体若しくはそれらの断片とHIVのgp120糖タンパク質とを反応させることを特徴とするHIVの検出方法。

【請求項 12】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体又はその断片、及び請求項5記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有するHIV検出用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗HIV抗体

【技術分野】

【0001】

本発明は、HIVの外皮膜に存在し分子量約120kDを有する糖タンパク質gp120に高親和性に結合する抗体及びその產生細胞に関する。また、本発明は、上記抗体を含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

後天性免疫不全症候群(AIDS)は、HIV(Human Immunodeficiency Virus)の感染後、徐々に感染者の免疫能が低下して合併症を起こすようになった状態を意味する。

【0003】

HIVは宿主の体内に侵入すると、CD4陽性細胞、特にCD⁺Tリンパ球(ヘルパーT細胞)に感染する。CD4陽性細胞への感染に関与するタンパク質は、HIVの外被糖タンパク質gp120である。gp120は、HIVの外皮膜に存在し、分子量約120キロダルトン(kD)を有する糖タンパク質であり、細胞表面のCD4を特異的受容体として結合する。そして、HIVはCD4⁺リンパ球に感染後、細胞内に侵入し、脱外被を起こして核酸(RNA)を遊離する。その後、逆転写酵素によるDNA合成、転写、翻訳がなされ、ウイルスタンパク質が合成される。ウイルスタンパク質は細胞膜に移動してウイルス粒子となり放出される。

【0004】

HIVは抗原変異が激しいため、ワクチンを作製することが困難であり、現在有効なワクチンは開発されていない。また、HIV遺伝子は感染細胞内の染色体に組み込まれるため、感染したHIVを完全に取り除くという根本的治療は極めて困難である。

【0005】

現在、AIDSの発病を遅らせ、延命効果が認められる薬剤としてAZT(アジトチミジン)などがあり、有効性が期待できる治療薬も次々と開発されつつある。しかしながら、まだ決定的な治療薬は確立していない。

【0006】

一方、HIVを効果的に中和する能力を持ち、AIDSの予防や診断に役立つ抗体を得るために種々の試みがなされている。gp120はHIVの感染にとって最も重要な分子の一つであるため(非特許文献1)、HIVの感染の効果的な抑制、感染予防及び診断には、gp120を標的とすることができる。これまでに、HIVのgp120の前駆体であるgp160のアミノ酸配列のうち、第308-331番目以内にある一つのエピトープを認識する「0.5β」と呼ばれる抗体が作製されている(特許文献1)。しかし、抗原との結合力をさらに高めるには、HIVのgp120と反応して、効果的にウイルスを中和することができる高親和性抗体を開発することが必要である。

【特許文献1】特許第2797099号公報

【非特許文献1】McDougal et. al., Science, 231, 382-385 (1986)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、HIVを中和する能力を有する高親和性抗体、及び該抗体を含む医薬組成物を提供することを目的とする。また、後天性免疫不全症候群の治療に用いられる医薬組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決するために誠意研究を行った結果、GAPNトランスジェニック動物を用いてgp120により免疫すると、HIVの活性を中和し、かつHIVと高親和性に結合する抗体を產生することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) HIVのgp120糖タンパク質と結合し、かつ、解離定数がKD=1.0×10⁻⁹ (M)以下の抗体又はその断片。

【0010】

上記抗体又はその断片は、gp120糖タンパク質のうち第308-330番目のアミノ酸配列（例えば配列番号6に示されるもの）の少なくとも一部を認識することができる。

【0011】

本発明の抗体又はその断片は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

(2) 上記抗体又はその断片のV領域を含む、ヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片。

(3) 配列番号6に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫したGANPトランスジェニック哺乳動物又はその子孫から採取される、高親和性抗体産生細胞。

(4) GANPトランスジェニック動物又はその子孫を、配列番号6に示すアミノ酸配列のうち少なくとも一部を含むポリペプチドを抗原として免疫し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする、抗HIV抗体又はその断片の製造方法。

(5) 上記(3)記載の細胞とミエローマ細胞との融合細胞を培養し、得られる培養物から抗体を採取することを特徴とする、抗HIV抗体又はその断片の製造方法。

(6) 上記(1)記載の抗体又はその断片、及び上記(2)記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有する医薬組成物。

【0012】

本発明の医薬組成物は、後天性免疫不全症候群の治療薬として使用することが可能である。

(7) 上記(1)記載の抗体若しくはその断片、又は上記(2)記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体若しくはそれらの断片とHIVのgp120糖タンパク質とを反応させることを特徴とするHIVの検出方法。

(8) 上記(1)記載の抗体又はその断片、及び上記(2)記載のヒト型化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの断片からなる群から選択される少なくとも1つを含有するHIV検出用キット。

【発明の効果】

【0013】

本発明により、GANP遺伝子トランスジェニック哺乳動物から得られる、高親和性抗HIV抗体、及び該抗体を含む医薬組成物が提供される。本発明の抗体は、KD=1.0×10⁻⁹ (M)以下の高親和性を有しているため、本発明の抗体を含む医薬組成物は、後天性免疫不全症候群(AIDS)の治療薬として使用することができる。

【0014】

さらに、本発明により、該抗体を產生する細胞、及び該抗体を利用したHIVの検出キットも提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

1. 概要

本発明の抗体は、GANPトランスジェニック哺乳動物に、HIVのgp120の一部、特にgp120のアミノ酸配列のうち第308-330のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として免疫することにより得られたものである。gp120のアミノ酸配列のうち第308-330番目の配列（「gp120(308-330)」という）を認識する抗体は、ウイルス中和活性、及び感染細胞による合胞体形成抑制活性を有することが知られているが（Skinner MA., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses (1988), 4(3), 187-197）、本発明の抗体は、gp120(308-330)と高親和性に結合することを特徴とするものである。

【0016】

ここで、GANPとは、胚中心結合核タンパク質(Germinal center-associated nuclear protein)と呼ばれている核タンパク質である。GANPは、遺伝子に変異を誘導するプロセスにおいて直接的及び間接的に必要な分子である。また、GANPは、遺伝子変異を修復する際に、高親和性の抗体が得られるようにV領域の変異の誘導を促す能力を保有していることから、GANPをコードする遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物（「GANPトランスジェニック哺乳動物」という）は、このGANP遺伝子の導入によって、獲得性免疫の高親和性抗体産生を促進することができる。また、このGANPトランスジェニック哺乳動物は、速やかに抗原に対する結合力の高い抗体を産生することができる。従って、上記トランスジェニック哺乳動物を、HIVのgp120のアミノ酸配列のペプチド（例えばgp120(308-330)）を抗原に用いて免疫することで、従来は得られないような高親和性の抗体を簡便に得ることができる。

【0017】

上述の通り、本発明により、HIV中和活性、感染細胞の合胞体形成抑制作用を有し、従来は得られないような高親和性の抗HIV抗体を得ることができる。そして、得られた抗体を含む医薬組成物は、AIDSの治療に用いることができる。

【0018】

上記抗体を産生する細胞は、gp120で免疫したGANPトランスジェニック哺乳動物から得られた脾臓B細胞又はリンパ節細胞単独でもよく、B細胞又はリンパ細胞とミエローマ細胞とを融合させたハイブリドーマ細胞でもよい。本発明は、上記抗体を産生する細胞についても提供する。

【0019】

さらに、HIV感染を確認する臨床検査においては、HIVを高感度に検出することが重要である。その検出手段として、本発明の高親和性抗HIV抗体を用いることができる。従って、本発明は、抗HIV抗体を含むHIV検出キットを提供するものである。

【0020】

2. 抗原の調製

HIVのgp120はデータベース等から配列情報を得ることが可能であり(PRF 1102247A, http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?prf:1102247A)、そのアミノ酸配列は配列番号5に示されるものである。

【0021】

そして、gp120(308-330)のポリペプチド配列は、

NNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKI (配列番号6)

で表される23アミノ酸残基であり(Lee Ratner et al., Nature 313, 277-284, 1985)、このアミノ酸配列のうちの少なくとも一部（全部又は一部）を含むポリペプチド又はペプチド（単にペプチドともいう）抗原として使用することができる。

【0022】

ここで、抗原に用いる上記配列番号6で示されるペプチド配列の「アミノ酸配列の少なくとも一部」とは、長さに特に限定されるものではない。例えば23アミノ酸残基のうち連続する8アミノ酸残基以上、例えば8、10、12、16、20、23アミノ酸残基が挙げられる。また、選択する場所は、配列番号6の中の連続したアミノ酸であれば特に限定されず、任意の場所を選択することができる。例えば、7~8アミノ酸残基を抗原に用いる場合には、配列番号6で示される23残基のアミノ酸配列を、N末端から順に7~8アミノ酸ずつ3つの領域に渡ってアミノ酸配列を選択してもよく、N末端から1アミノ酸ずつC末端側にずらした領域の配列を選択してもよい。

【0023】

抗原には、配列番号6及び上記のアミノ酸配列の少なくとも一部を、単独又は混合して用いることができる。

【0024】

また、上記ペプチドをキャリアタンパク質と結合させ、該ペプチドを側鎖として多数持つように抗原を作製してもよい。この場合は、上記ペプチドのN末端に、キャリアタンパ

ク質を結合させるためのシステイン残基を付加することができる。

【0025】

ペプチドの作製方法は、化学合成でも、大腸菌などを用いる生化学的合成でもよく、これらは当業者に周知の方法を用いることができる。

【0026】

本発明のペプチドの化学合成を行う場合は、ペプチドの合成の周知方法によって合成することができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DC C法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法等が挙げられる。また、その合成は、固相合成法及び液相合成法のいずれをも適用することができる。市販のペプチド合成装置（島津製作所製PSSM-8など）を使用してもよい。

【0027】

反応後は、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などの通常の精製法を組み合わせて本発明のペプチドを精製することができる。

【0028】

本発明のペプチドの生化学的合成を行う場合は、まず、該ペプチドをコードするDNAを設計し合成する。そして、上記DNAを適当なベクターに連結することによってタンパク質発現用組換えベクターを得、該組換えベクターを目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することによって形質転換体を得ることができる（Sambrook J and Russel D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition, CSHL Press, 2001）。

【0029】

ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミドDNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージが挙げられる。さらに、動物ウイルス、昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0030】

組換えベクターの作製は、精製されたDNAを適当な制限酵素で切斷し、適当なベクターDNAの制限酵素部位等に挿入してベクターに連結すればよい。

【0031】

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞又は昆虫が挙げられる。ヤギ等の哺乳動物を宿主として使用することも可能である。

【0032】

宿主への組換えベクターの導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。

【0033】

本発明において、本発明のペプチドは、前記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破碎物のいずれをも意味するものである。

【0034】

培養法は、当分野において周知である（前記Sambrookら、Molecular Cloningを参照）。

【0035】

培養後、目的ペプチドが菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによりペプチドを抽出する。また、目的ペプチドが菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、ペプチドの単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、目的のペプチドを単離精製すること

ができる。

【0036】

本発明においては、in vitro翻訳によるペプチド合成を採用することもできる。この場合は、RNAを鑄型にする方法とDNAを鑄型にする方法（転写／翻訳）の2通りの方法を用いることができる。例えば、鑄型DNAとしては、翻訳開始点の上流にプロモーターとリボゾーム結合部位を有している該ペプチドをコードするDNA、あるいは翻訳開始点の上流に転写に必要なプロモーター等が組み込まれたDNAが挙げられる。in vitro翻訳システムは、市販のシステム、例えばExpresswayTMシステム（Invitrogen社）、PURESYSTEM（登録商標；ポストゲノム研究所）、TNTシステム（登録商標；Promega社）などを用いることができる。in vitro翻訳システムによるペプチド合成後は、上記の一般的な生化学的方法を単独又は組み合わせることにより、目的のペプチドを単離精製することができる。

【0037】

上記のように得られたペプチドに結合させるキャリアタンパク質としては、牛血清アルブミン(BSA)、keyhole limpet hemocyanin(KLH)、human thyroglobulin、ニワトリガンマグロブリンを挙げることができる。

【0038】

3. GANP

GANPは、酵母Sac3タンパク質とホモロジーを有する210kDaの核タンパク質である(WO00/50611号公報)。そして、SAC3はアクチン形成の抑制物質として特徴づけられている。また、GANPは、濾胞樹状細胞(follicular dendritic cells: FDC)により囲まれる胚中心(germinal center, GC)B細胞において選択的にアップレギュレートされ、リン酸化依存性RNA-プライマーゼ活性を有し、B細胞の細胞周期調節に関与しているタンパク質である(Kuhara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328)。

【0039】

本発明においては、GANPタンパク質のアミノ酸配列を、マウスについて配列番号2に、ヒトについて配列番号4に示す。また、GANPタンパク質をコードする遺伝子(GANP遺伝子という)の塩基配列を、マウスについて配列番号1に、ヒトについて配列番号3に示す。なお、上記アミノ酸配列及び塩基配列は、国際公開WO00/50611号公報にも記載されている。

【0040】

またGANPタンパク質は変異体でもよく、配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列であってRNAプライマーゼ活性を有するタンパク質であってもよい。例えば、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列のうち1若しくは複数個(好ましくは1個又は数個(例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個))のアミノ酸が欠失しており、1若しくは複数個(好ましくは1個又は数個(例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されており、及び/又は1若しくは複数個(好ましくは1個又は数個(例えば1個～10個、さらに好ましくは1個～5個))の他のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上記GANPタンパク質と同様のRNAプライマーゼ活性を有するGANP変異型タンパク質を使用することもできる。

【0041】

「RNAプライマーゼ活性」とは、RNA複製において、5'→3'方向に進む鎖の伸長とは逆向きの鎖(ラギング鎖)を合成する際に、伸長の開始点となる短いプライマーのRNAを合成する酵素活性を意味する。通常は α プライマーゼと呼ばれるDNAポリメラーゼ α と結合する分子が用いられるが、胚中心B細胞では第二のプライマーゼであるGANPプライマーゼも誘導されている。

【0042】

GANPタンパク質は、上記配列番号2若しくは4に示すアミノ酸配列又はこれらの変異型アミノ酸配列のほか、N末端側の一部の配列(例えば配列番号2に示すアミノ酸配列の1～600番、好ましくは139～566番)又はこれらの変異型アミノ酸配列を有するものも含まれる。

【0043】

本発明において、動物に導入するためのGANP遺伝子は、上記GANPタンパク質、N末端側の一部の配列、又は変異型タンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。そのような遺伝子として、例えば配列番号1又は3に示す塩基配列を有するものを使用することができる。配列番号1又は3に示す塩基配列のうち、コード領域のみの塩基配列であってもよい。また、上記配列番号1又は3に示す塩基配列に相補的な配列と、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、RNAプライマーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を使用することも可能である。

【0044】

「ストリンジエントな条件」とは、ハイブリダイズさせた後の洗浄時の条件であって塩（ナトリウム）濃度が150～900mMであり、温度が55～75℃、好ましくは塩（ナトリウム）濃度が250～450 mMであり、温度が68℃での条件をいう。

【0045】

遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法や Gapped duplex法等の公知手法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えばGeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km等：タカラバイオ社製) を用いて行うことができる。

【0046】

変異遺伝子の詳細並びに取得方法は国際公開W000/50611号公報にも記載されている。

【0047】

なお、抗μ抗体及び抗CD-40モノクローナル抗体でB細胞をin vitro刺激すると、GANP発現のアップレギュレーションのみならず、GANPタンパク質のアミノ酸配列のうち特定のセリン残基（例えば502番目のセリン：S502）のリン酸化を引き起こす。この反応は、GANPのRNA-プライマーゼ活性についてキーとなる反応である(Kuwahara, K. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10279-10283)。GANPタンパク質のN末端側のRNA-プライマーゼドメインはセリン残基を含んでおり、そのリン酸化はin vitroにおいてCdk2によって触媒される。C末端側ドメインにより、GANPはMCM3複製ライセンシング因子に結合する(Kuwahara, K. et al., (2000) Blood 95, 2321-2328; Abe, E. et al. (2000) Gene 255, 219-227)。

【0048】

なお、GANP遺伝子欠損マウスは胎生致死であるが、CD19Creマウスとflox-ganp遺伝子のマウスを交配して作製したB細胞に選択的にGANP遺伝子を欠損したconditional targetingマウスを作製して、T細胞依存性抗原であるnitrophenyl (NP)-ニワトリガンマグロブリン抗原で免疫してNP-ハプテン特異的な抗体産生を調べたところ、高親和性抗体産生が著しく障害されており、GANP分子が抗体の親和性亢進に重要な機能をしていることが明らかになった。

【0049】

4. GANP遺伝子を導入したトランスジェニック哺乳動物

gp120による免疫の対象となる動物は、GANP遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物であり、当該トランスジェニック哺乳動物は、好ましくは、導入したGANP遺伝子をB細胞で発現することができる。

【0050】

(1) GANP遺伝子とその関連分子

GANP遺伝子とその関連分子で形成される複合体は、遺伝子に変異を誘導するプロセスで直接および間接的に必要な分子である。GANPタンパク質は、遺伝子変異を修復する際に、高親和性の抗体が得られるようにV領域の変異の誘導を促す能力を保有していることから、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、このGANP遺伝子又はその変異遺伝子の導入によって、獲得性免疫の高親和性抗体産生を促進することができる。また、この遺伝子を過剰に発現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、速やかに抗原に対する結合力の高い

抗体を産生することができる。従って、上記トランスジェニック非ヒト哺乳動物を所定の抗原で免疫することで、従来では得られないような高親和性の抗体を簡便に得ることができる。その結果、難治性の病原微生物や異物を排除できるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を得ることができる。また、本発明のトランスジェニック哺乳動物を用いてヒト型化抗体を作製することによって、あるいは、本発明のトランスジェニック哺乳動物が産生する抗体のV領域を含む一本鎖抗体を作製することによって、抗体療法の効力を飛躍的に高めることができる。

【0051】

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、GANP又はその変異遺伝子の導入によって、B細胞で高親和性抗体の産生を促進することができ、前記高親和性抗体産生細胞はアポトーシスを誘導するシグナルに対して抵抗性を有する。

【0052】

(2) GANP遺伝子導入用哺乳動物

本発明における「哺乳動物」とは、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター及びモルモット等の任意の非ヒト哺乳動物を意味し、好ましくはマウス、ウサギ、ラットまたはハムスターであり、特に好ましくはマウスである。

【0053】

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）の細胞に対して、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより、GANP遺伝子を導入することにより作製することができる。また、上記遺伝子導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とするGANP遺伝子を転移させ、細胞培養、組織培養などに利用することもできる。さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより、トランスジェニック哺乳動物を作製することもできる。

【0054】

GANP遺伝子を対象動物に導入させる際、当該遺伝子を対象となる動物の細胞で発現させるプロモーターの下流に連結した遺伝子構築物として導入することが好ましい。具体的には、目的とするGANP遺伝子を有する各種哺乳動物由来のGANP遺伝子を発現させうる各種プロモーターの下流に、GANP遺伝子を連結したベクターを、対象となる哺乳動物の受精卵（例えば、マウス受精卵）にマイクロインジェクションすることによって、目的とするGANP遺伝子を高発現するトランスジェニック哺乳動物を作製することができる。

【0055】

(3) 発現ベクター

GANP遺伝子の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルス又はバキュロウイルスなどの動物又は昆虫ウイルスなどが用いられる。

【0056】

遺伝子発現の調節を行うプロモーターとしては、たとえばウイルス由来遺伝子のプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）および鳥類（ニワトリなど）由来遺伝子のプロモーターなどを使用することが可能である。

【0057】

ウイルス由来遺伝子のプロモーターとしては、例えはサイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス等由来遺伝子のプロモーターが挙げられる。

【0058】

各種哺乳動物及び鳥類由来遺伝子のプロモーターとしては、例えは、アルブミン、インスリンII、エリスロポエチン、エンドセリン、オステオカルシン、筋クレアチニナーゼ

、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1,K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、心房ナトリウム利尿性因子、ドーパミン β -水酸化酵素、内皮レセプターチロシンキナーゼ、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインI及びIIA、メタロプロテイナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原、平滑筋 α アクチン、ポリペプチド鎖延長因子1 α (EF-1 α)、 β アクチン、 α 及び β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1及び2、ミエリン基礎タンパク、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、レニンなどの遺伝子のプロモーターが挙げられる。

【0059】

上記ベクターは、トランスジェニック哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結するターミネーターを有していてもよい。その他、GANP遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核生物遺伝子のイントロンの一部をプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間、あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも所望により可能である。

【0060】

本発明の好ましい態様では、免疫グロブリンプロモーターの下流にGANP遺伝子を連結することにより、あるいはヒト免疫グロブリン遺伝子イントロンエンハンサー部分をGANP遺伝子の5'側に連結することにより、GANP遺伝子をB細胞で選択的に発現させることができる。

【0061】

(4) GANP遺伝子の導入

受精卵細胞段階におけるGANP遺伝子の導入は、対象の哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保することが好ましい。遺伝子導入後の作出動物の胚芽細胞においてGANP遺伝子が過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てにGANP遺伝子を過剰に有することを意味する。そして、遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てにGANP蛋白質を過剰に有する。

【0062】

本発明においては、導入遺伝子を相同染色体の一方に持つヘテロ接合体を取得し、ヘテロ接合体同士を交配することで導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモ接合体を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が導入されたGANP遺伝子を安定に保持する。そして、GANP遺伝子を過剰に有することを確認して、通常の飼育環境で繁殖継代することができる。

【0063】

トランスジェニック対象動物が有する内在性の遺伝子とは異なる遺伝子である外来性GANP遺伝子を対象非ヒト哺乳動物（好ましくはマウスなど）、又はその先祖の受精卵（バッククロス）に転移する際に用いられる受精卵は、同種の雄哺乳動物と雌哺乳動物を交配させることによって得られる。

【0064】

受精卵は自然交配によっても得られるが、雌哺乳動物の性周期を人工的に調節した後、雄哺乳動物と交配させる方法が好ましい。雌哺乳動物の性周期を人工的に調節する方法としては、例えば、初めに卵胞刺激ホルモン（妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)）、次いで黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)）を、例えば腹腔注射などにより投与する方法が好ましい。

【0065】

得られた受精卵に、前述の方法により外来性GANP遺伝子を導入した後、雌哺乳動物に人工的に移植・着床することにより、外来性遺伝子を組み込んだDNAを有する非ヒト哺乳動物が得られる。雌哺乳動物に黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)を投与後、雄哺乳動物と交配させることにより受精能を誘起された偽妊娠雌哺乳動物に、受精卵を人工的に移植・着床させる方法が好ましい。遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランス

ジェニック哺乳動物個体の産出効率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNAのマイクロインジェクションが好ましい。

【0066】

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（マウスの場合には、例えば、尾部先端）からDNAを抽出し、サザン解析やPCR法により導入遺伝子の存在を確認することができる。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代（Founder）とすれば、導入遺伝子はその子（F1）の50%に伝達される。さらに、このF1個体を野生型動物または他のF1動物と交配させることにより、2倍体染色体の片方（ヘテロ接合）または両方（ホモ接合）に導入遺伝子を有する個体（F2）を作製することができる。

【0067】

あるいは、GANP蛋白質高発現トランスジェニック哺乳動物は、上記したGANP遺伝子をES細胞（embryonic stem cell）に導入することによって作製することもできる。例えば、正常マウス胚盤胞（blastocyst）に由来するHPRT陰性（ヒポキサンチングアミニ・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を欠いている）ES細胞に、GANP遺伝子を導入する。当該GANP遺伝子がマウス内在性遺伝子上に相同組み換えを起こさせ、インテグレートされたES細胞をHATセレクション法により選別する。次いで、選別したES細胞を、別の正常マウスから取得した受精卵（胚盤胞）にマイクロインジェクションする。得られた胚盤胞を、仮親としての別の正常マウスの子宮に移植する。その後、仮親マウスからキメラトランスジェニックマウスが生まれる。生まれたキメラトランスジェニックマウスを正常マウスと交配させることにより、ヘテロトランスジェニックマウスを得ることができる。そして、ヘテロトランスジェニックマウス同士を交配することにより、ホモトランスジェニックマウスが得られる。

【0068】

本発明においては、上記したトランスジェニック哺乳動物に限らず、その子孫、並びにトランスジェニック哺乳動物又はその子孫の一部も本発明の範囲内である。トランスジェニック哺乳動物の一部としては、当該トランスジェニック哺乳動物又はその子孫の組織、器官及び細胞などが挙げられ、器官または組織としては、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髓あるいは扁桃腺などが挙げられ、細胞としてはB細胞などが挙げられる。

【0069】

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、B細胞をさらに活性化する哺乳動物と交配することも可能であり、これによりさらに高親和性抗体を產生することが可能である。

【0070】

最近、MRL/lprマウスでB細胞が末梢のリンパ節での活性化の際に胚中心を経過した後、T細胞領域でさらにV領域の突然変異誘導が亢進していることが報告されている。また、本発明者らもMRL/lprマウスにおいてGANP遺伝子がIgプロモーター、エンハンサーの下流に結合して作製したganpトランスジェニックマウスに見られるのと同等の高い発現が、非免疫の状態で見られることを見出している。このことは、正常では自己の抗原に対しては高親和性の抗体はできないのに対して、この自己免疫疾患マウスでは、GANP分子の異常な活性化が起こるために、自己の抗原に対しての高親和性抗体が產生されることとなる可能性が示唆される。

【0071】

そこで、上記B細胞をさらに活性化する動物として、自己免疫疾患マウスであるとされるMRL/lpr、NZB、(NZB x NZW)F1などを用いれば、さらに高い変異誘導を期待できる。

【0072】

以上のことを利用したMLR/lprマウスのGANPトランスジェニックマウスを作製することによって、スーパー高親和性抗体産生マウスを作出できる可能性がある。すなわち、本発明のGANP遺伝子過剰発現トランスジェニック哺乳動物とさまざまな自己免疫疾患モデル動物との交配により、高親和性抗体を產生できる哺乳動物を作製することができる。

【0073】

5. HIV gp120に対する高親和性抗体の作製

(1) 高親和性抗体

本発明において「抗体」とは、抗原であるgp120のアミノ酸配列第308-330番目のペプチドに結合し得る抗体分子全体（ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であっても良い）またはその断片を意味する。また、本発明の抗体のアイソタイプは特に限定されず、例えば、IgG(IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄)、IgM、IgA(IgA₁、IgA₂)、IgD又はIgEである。

【0074】

本発明では、抗原に対する反応性が高い抗体のことを高親和性抗体という。「高親和性」とは、抗体が抗原と結合する結合能が高いことを意味し、抗体の結合能が一般のマウスなどの動物を用いて作製した抗体と比較して高く、また逆に当該抗原から解離することが遅い抗体のことをいう。これはエピトープに対して、立体的に密接して結合する能力が高く特異的であることを意味すると共に、抗体が結合することによってエピトープのみならずその抗原の構造の変換をきたすことによって結果的に強力な活性、例えば毒素中和活性、HIVの感染性阻止、不活性化などの生物活性を示すことも包含している。

【0075】

抗体の結合能（親和性）は、スキヤッチャード解析やBiacoreと呼ばれる表面プラズモン共鳴センサーにより、解離定数(KD)、解離速度定数(Kdiss)、結合速度定数(Kass)として測定することができる。Biacore装置は、センサーチップ、マイクロ流路系、SPR検出系の3つの技術を統合して分子結合の強さ、速さ、選択性を測定するというものであり、標識を使わずにリアルタイムで生体分子の検出と複数個の分子間での相互作用のモニタリングを行うことができる。Biacore装置としては、例えばBiacore 3000、Biacore 2000、Biacore X、Biacore J、Biacore Q（いずれもBiacore社）などが挙げられる。

【0076】

上記Biacoreによって、抗体の親和性を示すパラメーター、すなわち解離定数(KD)、解離速度定数(Kdiss) [1/Sec] 及び結合速度定数(Kass) [1/M. Sec]を測定する。

【0077】

抗体は、解離定数（KD値）が小さい値であるほど親和性が高いといふ点で好ましい。抗体の結合能（親和性）は、Kdiss及びKassの2つのパラメーターにより決定され、

$$KD[M] = Kdiss/Kass$$

により表わされる。

【0078】

抗原の種類等複数の要因によって、得られる抗体の親和性は異なるが、KD値は 1×10^{-9} (M)以下であることが好ましく、 1.5×10^{-10} (M)以下であることがより好ましく、 1.0×10^{-10} (M)以下（特に 9.9×10^{-11} (M)以下）であることがさらに好ましい。

【0079】

本発明においては、作製された抗体が上記いずれかの作用又は性質を發揮する抗体であるときに、高親和性であると判断される。

【0080】

本発明の抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体及び活性フラグメント）は、種々の方法のいずれかによって製造することができる。このような抗体の製造法は当該分野で周知である。

【0081】

(2) ポリクローナル抗体の作製

上記の通り作製した抗原をGANPトランスジェニック哺乳動物に投与する。哺乳動物は特に限定されものではなく、例えばラット、マウス、ウサギなどを挙げることができるが、GANPトランスジェニックマウス、又はGANPトランスジェニックウサギが好ましい。

【0082】

抗原の動物一匹あたりの投与量は、アジュバントを用いないときは、5～50 mgであり、アジュバントを用いるときは0.5～2 mgである。アジュバントとしては、フロイ

ント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、シリカアジュバント、市販の免疫賦活薬等が挙げられる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内等に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは1~5週間間隔で、1~10回、好ましくは2~3回免疫を行う。そして、最終の免疫日から6~60日後に酵素免疫測定法(ELISA[enzyme-linked immunosorbent assay]又はEIA[enzyme immunoassay])、放射性免疫測定法(RIA[radioimmuno assay])等で抗体価を測定し、所望の抗体価を示した日に採血し、抗血清を得る。上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティーコロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0083】

その後は、抗血清中のポリクローナル抗体の反応性をELISA法などで測定する。

【0084】

(3) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産生細胞の採取

前記のように作製した抗原を、GAPNトランスジェニック哺乳動物、例えばラット、マウス、ウサギなどに投与する。抗原の動物一匹あたりの投与量はアジュバントを用いないときは、0.05~2mgであり、アジュバントを用いるときは0.05~2mgである。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)、水酸化アルミニウムアジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係から、FCAとFIAとを組み合わせて使用することが好ましい。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫動物は、抗原の初回免疫後、さらに、追加免疫を数回行い、適当な日数を経過した後に部分採血を行い、上記方法で抗体価を測定することが好ましい。本発明の方法で產生される抗体は高親和性抗体であるため、上記免疫は初回のみで十分である可能性がある。免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔、好ましくは2~5週間間隔で、1~10回、好ましくは1~5回免疫を行う。そして、最終の免疫日から1~60日後、好ましくは1~14日後に抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞などが挙げられるが、脾臓細胞、又は局所リンパ節細胞が好ましい。

【0085】

上記のようにして得られる本発明の高親和性抗体産生細胞も本発明に含まれる。

【0086】

(b) 細胞融合

例えば、GAPNトランスジェニックマウスを用いた場合、ハイブリドーマを得るために、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、マウスなどの動物の一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。ミエローマ細胞としては、例えば、P3-X63・Ag8(X63)、P3-X63・Ag8・U1(P3U1)、P3/NS I/1-Ag4-1(NSI)、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)等のマウスミエローマ細胞株を挙げることができる。ミエローマ細胞の選択に当たっては、抗体産生細胞との適合性を適宜考慮する。

【0087】

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。細胞融合は、血清を含まないDMEM、RPMI-1640培地などの動物細胞用培地中で、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個/mlの抗体産生細胞と $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlのミエローマ細胞とを混合し(抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞比5:1が好ましい)、細胞融合促進剤存在の下で融合反応を行う。細胞融合促進剤として、平均分子量1000~6000ダルトン(D)のポリエチレングリコールなどを使

用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

【0088】

(c) ハイブリドーマの選別及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、細胞懸濁液を例えればウシ胎児血清含有RPMI-1640培地などに適当に希釀後、マイクロタイタープレート上にまき、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。その結果、選択培地で培養開始後、14日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0089】

次に、増殖してきたハイブリドーマの培養上清中に、gp120に反応する抗体が存在するか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは、通常の方法に従えばよく、特に限定されるものではない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採取し、ELISA、EIA、RIAなどによってスクリーニングすることができる。

【0090】

融合細胞のクローニングは、限界希釀法等により行う。gp120に強い反応性を示す抗体であって、親和性を示す値が $KD = 1 \times 10^{-9}$ (M)以下である抗体を産生するハイブリドーマを選択し、樹立する。

【0091】

(d) モノクローナル抗体の採取

樹立したハイブリドーマを培養し、得られる培養物からモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法、又は腹水形成法等を採用することができる。「培養」とは、上記ハイブリドーマをシャーレやディッシュで生育すること、または上記ハイブリドーマを下記のように腹腔内で増殖することを意味する。また、「培養物」とは、培養上清、培養細胞若しくはその破碎物、又は腹水のいずれをも意味するものである。

【0092】

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培地、MEM培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37°C、5%CO₂濃度）で7~14日間培養し、その培養上清から抗体を取得する。

【0093】

腹水形成法の場合は、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種系動物の腹腔内にハイブリドーマを約 1×10^7 個投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~2週間後に腹水を採取する。

【0094】

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルfiltration、アフィニティーコロマトグラフィー等の公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

【0095】

(e) モノクローナル抗体の結合領域の利用

モノクローナル抗体はHIV抗原に結合することで感染阻止、およびHIVウイルスの中和、排除を行う活性を有するが、その際にはH鎖ではどのV領域遺伝子を用いているか、どのD領域の遺伝子、J領域遺伝子を用いているか、さらにN配列が挿入されているか、またどのL鎖のV領域遺伝子を用いているか、J領域遺伝子を用いているかが高親和性抗体作製の基盤になる。しかし、結合親和性に関しては、これらに加えて、末梢のリンパ組織で誘導されるV領域遺伝子の体細胞突然変異の程度によって大きく変化する。ここではモノクローナル抗体の抗原結合に関わる領域、すなわちH鎖とL鎖のそれぞれ3つのCDR領域の構造によって、体細胞突然変異の程度が決まる。したがって、本発明で得られる高親和性の結合領域の情報を用いれば、ヒトのEBウイルスでトランスフォームした記憶B細胞株で抗HIV抗体産生細胞を樹立して、そのV領域にここで得られている情報を直接遺伝子操作技術で導

入することによって高親和性抗体を得ることも可能である。

【0096】

(4) 抗体断片、ヒト型化抗体又はヒト化抗体

上記の抗体の断片及びV領域の一本鎖抗体も本発明の範囲内である、抗体の断片としては、前述したポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の一部分の領域を意味し、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv(variable fragment of antibody)、sFv、dsFv(disulphide stabilized Fv)、あるいはdAb(single domain antibody)等が挙げられる。一本鎖抗体は、V_L (L鎖可変領域)とV_H (H鎖可変領域)をリンカーでつないだ構造を持つ。

【0097】

本発明の高親和性抗体は、ヒト型化抗体やヒト抗体でも良い。これらの抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えた哺乳動物を用いて、該哺乳動物を免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することができる。

【0098】

ヒト型化抗体を作製する場合は、マウス抗体の可変領域から相補性決定領域(complementary determining region; CDR)をヒト可変領域に移植して、フレームワーク領域(FR)はヒト由来のものを、CDRはマウス由来のものからなる再構成した可変領域を作製する。

【0099】

次にこれらのヒト型化された再構成ヒト可変領域をヒト定常領域に連結する。ヒト型化抗体の作製法は、当分野において周知である。

【0100】

ヒト抗体は、一般にV領域の抗原結合部位、すなわち超過変領域(Hyper Variable region)についてはその特異性と結合親和性が問題となるが、構造的にどの動物で作製してもかまわない。一方V領域のその他の部分や定常領域の構造は、ヒトの抗体と同じ構造をしていることが望ましい。ヒトに共通の遺伝子配列については遺伝子工学的手法によって作製する方法が確立されている。

【0101】

(5) 抗体の特性

本発明のGANTトランスジェニック哺乳動物より產生される抗体は、以下の(i)～(iv)の少なくとも1つの性質を有する。

【0102】

(i) HIVの外被膜にある分子量120kDの糖タンパク質抗原gp120と結合して、HIVを中和する。

【0103】

(ii) HIVに感染された細胞の表面に結合することによって、感染された細胞と感染されないT細胞により誘発される合胞体の形成を阻止する。

【0104】

(iii) gp120(308-330)の領域の少なくとも一部のエピトープを認識する。

【0105】

(iv) gp120(308-330)領域の少なくとも一部に対し、高親和性($K_D=1 \times 10^{-9}$ (M)以下)に結合する。

【0106】

合胞体とは、感染細胞が非感染細胞を取り込んで一つの細胞になることをいう。in vitroでHIVを細胞と培養すると、合胞体が形成されることがあり、このような合胞体は、生存できずに死滅する。HIVの中でも合胞体を作りやすいSI型HIVの感染者では、CD4⁺リンパ球の減少が早く、エイズへの進展が早く起こることが知られている。

【0107】

6. 医薬組成物

本発明の高親和性抗体は、AIDSの病原であるHIVを抗原として、その活性を中和させる作用を有するため、AIDSの治療又は予防用医薬組成物として有用である。本発明の医薬組成物は、本発明の高親和性抗体又はその断片を有効成分として含み、さらに薬学的に許容

される担体を含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

【0108】

ここで「薬学的に許容され得る担体」とは、賦形剤、希釈剤、增量剤、崩壊剤、安定剤、保存剤、緩衝剤、乳化剤、芳香剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味剤、溶解補助剤あるいはその他の添加剤等が挙げられる。そのような担体の一つ以上を用いることにより、注射剤、液剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤あるいはシロップ剤等の形態の医薬組成物を調製することができる。これらの医薬組成物は、経口あるいは非経口的に投与することができる。非経口投与のためのその他の形態としては、一つまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される注射剤などが含まれる。

【0109】

本発明の薬剤の投与量は、患者の年齢、性別、体重及び症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該薬剤に含有される活性成分である高親和性抗体の種類などにより異なるが、通常成人一人当たり、一回につき $10\mu\text{g}$ から 1000mg 、好ましくは $10\mu\text{g}$ から 100mg の範囲で投与することができるが、この範囲に限定されるものではない。体液量は、体重を 60kg とすると 5リットル と産出できる。抗体の有効な濃度はin vitroの実験では $5\sim50\mu\text{g}/\text{ml}$ である場合が多く、単純に計算すると $25\sim250\text{mg}$ の抗体が少なくとも数日間体内で存在することが望ましい。

【0110】

例えば、注射剤の場合には、例えば生理食塩水あるいは市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に $0.1\mu\text{g}$ 抗体/ ml 担体～ 10mg 抗体/ ml 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤は、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において 1kg 体重あたり、 $1\mu\text{g}\sim100\text{mg}$ の割合で、好ましくは $50\mu\text{g}\sim50\text{mg}$ の割合で、1日あたり1回～数回投与することができる。投与の形態としては、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射あるいは腹腔内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、場合により、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類など）、懸濁剤あるいは乳濁剤として調製することもできる。そのような注射剤の無菌化は、フィルターによる濾過滅菌、殺菌剤の配合等により行うことができる。注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。

【0111】

7. HIV検出キット

本発明の高親和性抗体は、疾患の診断、治療又は予防のための薬剤として有用である。

【0112】

本発明の抗体を用いたHIV感染の検出は、被験者から採取した検体、例えば唾液や血液等と本発明の抗体又はその断片とを抗原抗体反応によって結合させ、結合した抗体量により検体中の目的とする抗原の量を測定することにより行う。抗体量の検出は、公知の免疫学的測定法に従って行えばよく、例えば、免疫沈降法、免疫凝集法、標識免疫測定法、免疫比懸濁法などを用いることができる。特に、標識免疫測定法が簡便且つ高感度という点で好ましい。標識免疫測定法では、検体中の抗体価は標識抗体を用いて直接検出した標識量で表すほか、既知濃度あるいは既知抗体価の抗体を標準液として相対的に表してもよい。すなわち、標準液と検体を測定計により測定し、標準液の値を基準にして検体中の抗体価を相対的に表すことができる。標識免疫測定法としては、公知の測定法、例えばELISA法、EIA法、RIA法、蛍光免疫測定法(Fluoroimmunoassay : FIA)、化学発光免疫測定法(Luminescence immunoassay)などを任意に利用することができる。

【0113】

また、本発明の高親和性抗体を利用することにより、AIDS治療薬の薬効評価を高感度に行うことができる。本発明の高親和性抗体を利用した薬効評価方法は、AIDS患者あるいはヒトリンパ細胞を移入して作製したAIDSモデル動物(SCID-Huマウス)に対して薬剤を投

与後、これら生体中のHIVあるいは各モデル動物に対する免疫不全ウイルスの量を本発明の抗体を用いて検出し、その量を比較することにより、生体中の抗原の量を通してAIDS治療薬としての薬効を評価することができる。その際、従来の抗体に比べて2倍から100倍の感度を有することが期待できる。

【0114】

本発明の高親和性抗体は、各種疾患診断用キットの形態で提供することができる。該キットは、本発明の診断方法や本発明の薬効評価方法に使用することができる。また、輸血製剤や、生体サンプルのHIVウイルス感染有無のチェックをするための、高感度で、敏速で、簡便なキットとして使用できる。本発明のキットは以下の(a)及び(b)から選ばれる少なくとも一つ以上を含む。

【0115】

(a)本発明の抗体又はその標識物

(b)前項(a)記載の抗体又はその標識物を固定した固相化試薬

ここで、抗体の標識物とは、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、または化学発光化合物によって標識されたものを意味する。

【0116】

本発明のキットは、上記の構成要素の他、本発明の検出を実施するための他の試薬、例えば標識物が酵素標識物の場合は、酵素基質（発色性基質等）、酵素基質溶解液、酵素反応停止液、あるいは検体用希釀液等を含んでいても良い。

【0117】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0118】

本実施例は、通常免疫に用いられることが多いBalb/c マウス、野生型（WT）マウス及びGANPトランスジェニック（Tg）マウスの3種のマウスに、免疫抗原としてHIVの中和活性が期待できるHIV24NL43（308-330）のペプチドをキャリアー蛋白に結合したものを免疫した。それぞれのマウスの中から各2匹を用いて細胞融合を行い、ELISA法、BIACOREによる測定にてスクリーニングし、陽性ハイブリドーマを得た。さらに各ハイブリドーマから得られた精製抗体を用いて、ELISA法およびBIACOREを用いた解析を実施した。

【0119】

その結果、GANPトランスジェニック（Tg）マウスから得られたモノクローナル抗体（3クローナン）は、かなりの高親和性モノクローナル抗体であり、親和性の指標となる解離定数は高いものではKD（ $KD = k_{diss} / k_{ass}$ ）= $9.90 \times 10^{-11} (M)$ であった。

【実施例1】

【0120】

GANPトランスジェニック（Tg）マウスの作製

マウスへの導入用遺伝子は、pLGベクターのXhoIサイトに5.6 kbのマウスGANP遺伝子を挿入して作製した。このベクターはヒト免疫グロブリンイントロンエンハンサー領域（2 kb EcoRIフラグメント）を持ち、B細胞での強力な発現を行う、特異的ベクターである。この遺伝子を直線化してマウスに遺伝子導入を行った。マウスGANP全長cDNAを含む線状化したpLG vector（Koike, M. et al. Int. Immunol. 7, 21-30 (1995)）をC57BL/6マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。マウスの尾のゲノムDNAおよび以下のプライマー及び反応液を用いて導入遺伝子の存在についてスクリーニングした（図1、上パネル）。図1上パネルにおいて、5.3kb付近のバンドはGANP遺伝子のものである。

【0121】

1-5' プライマー：5'-TCCCGCCTTCCAGCT GTGAC-3'（配列番号7）

1-3' プライマー：5'-GTGCTGCTGTGTTATGTCCT-3'（配列番号8）

反応液組成：

DNA (50 ng/ μ l)	1 μ l
10x buffer	2.0 μ l
2.5 mM dNTP mix	2.0 μ l
1-5' primer (10 μ M)	0.8 μ l
1-3' primer (10 μ M)	0.8 μ l
Z-Taq DNA polymerase	0.1 μ l
dH ₂ O	13.3 μ l

反応条件：

[98°C 5 sec; 59°C 5 sec ; 72°C 10 sec] ×35 サイクル
4°C

GANP mRNAの発現が亢進しているか否かは、RT-PCRで確認した。

【0122】

全RNAは、脾臓又は脾臓B細胞からTrizol (Invitrogen) を用いて抽出し、RT-PCRは、2種のプライマー1-5' 及び 1-3' を用いて行い、cDNAを合成した (Kuwahara, K. et al., Blood 95, 2321-2328 (2000))。GANP 転写物はアガロースゲル電気泳動により検出した。β-アクチン転写物は対照として用いた。

【0123】

その結果、GANPトランスジェニックマウスは、B細胞でGANPの発現の増加を示し（図1、下パネル）、骨髓、脾臓及びリンパ節の細胞の表層マーカー分析において、B系細胞の通常の分化を示した。

【実施例2】

【0124】

抗体の作製

(1) 材料

- (a) 動物： Balb/c マウス、野生型 (WT) マウスとGANPトランスジェニック (Tg) マウス
- (b) 免疫抗原： HIV24NL43ペプチド K L H コンジュゲーション
- (c) ELISA抗原： HIV24NL43 ペプチド（配列： CNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKI（配列番号 9))
- (d) ミエローマ細胞： P3-X63.Ag8.U1
- (e) 2次抗体： HRP標識抗マウス抗体 IgG・A・M

(2) 方法

上記3種のマウスの各5匹に、免疫抗原としてNL42ペプチド（キャリアータンパク質： KLH）を、2週間おきに3回免疫し、3回免疫後採血抗血清を用いて抗体価をELISA法にて測定した。

【0125】

この中から、力価の高いマウス各2匹から抗体産生細胞（脾細胞）を採取し、脾細胞とP3U1ミエローマ細胞との細胞融合を実施した。GANP-Tgマウスの脾細胞数が 0.2×10^5 /ウェルになるようにまきこみ、それぞれ、Balb/c マウス：5448クローン、野生型 (WT) マウス：1888クローン、GANPトランスジェニック (Tg) マウス：2016クローンをHAT培地にて培養した。

【0126】

HAT培養9日後の培養上清を用いて、NL42ペプチド（1マイクロg/mL）を固相化抗原としてELISA法を実施した。GANP-TgマウスおよびWTの培養上清の母集団のそれぞれから、ELISAの結果にて490nm吸光度1.50以上のクローンを選び出し、HT培地にてクローンングを実施した。

【0127】

HT培養9日後の培養上清を用いて、NL42ペプチド（1マイクロg/mL）を固相化抗原としてELISA法を実施した結果、Balb/cマウスは3クローン（クローン名：B1-10, B2-24, B2-27）、野生型(WT)マウスは9クローン（クローン名：W1-2, W1-7, W1-8, W1-10, W1-21, W1-43, W1-45, W1-63, W1-84）、GANPトランスジェニック(Tg)マウスTgは8クローン（クローン名：G1-22, G1-68, G1-124, G1-165, G1-181, G2-231, G2-10, G-25）のハイブリドーマを樹立した。

【0128】

GANP-Tgマウス、WTのそれぞれのクローンをRPMI培地にて培養し、さらに、無血清培地であるSFM培地にて培養し、Protein G精製によって、抗ペプチドモノクローナル精製抗体を作製した。

【実施例3】

【0129】

親和性測定

上記実施例2で作製した各モノクローナル抗体を用いて、以下の評価検討を実施した。

【0130】

抗体の親和性を評価するにあたり、ELISA法とBIACOREによる解析を実施した。

【0131】

まず、ELISA法は、HIV24NL43ペプチド 1マイクロg/mLをそれぞれ固相化抗原として用い、室温にて1時間固相化した。PBSTween20洗浄後、2.0% skim milkにてブロッキングを実施した。さらにPBSTween20洗浄後、評価する抗ペプチドモノクローナル抗体（0.457～1マイクロg/mL）を用いて、室温にて1時間反応させた。次に、サンプルをPBSTween20洗浄後、HRP標識抗マウスIgG・A・Mと室温にて1時間反応させた。さらに、PBSTween20洗浄し、オルトフェニレンジアミン(OPD)にて5分間発色させ、2N硫酸を用いて反応を停止した。

【0132】

吸光度は、ELISA PLATE READERを用いて、490nmにて測定した。

【0133】

ELISAの結果を図2に示す。

【0134】

GANP-Tgマウスを用いることにより、極めて高い結合能を有する3つの抗体が作製された（図2、吸光度1.4～2.1付近）。これらのモノクローナル抗体のクローン名は、吸光度の高い順にG1-181、G2-10、G2-25である。

【0135】

次に、BIACOREを用いて物理化学的結合能を調べた。

【0136】

BIACOREによる解析は、HIV24NL43ペプチドをリガンドとしてBIACOREセンサーチップに結合させたものに、アナライト溶液として、抗ペプチドモノクローナル抗体を用いて、それぞれの結合速度定数(k_{ass})、解離速度定数(k_{diss})、そして親和性の指標となる解離定数KD($KD = k_{diss} / k_{ass}$)を算出した。KDが低い程、親和性は高いと評価される。

【0137】

抗体の親和性の総合評価として、各クローンの解離定数とELISAの結果を合わせて、図3に示す。図3において、クローンと解離定数との関係は以下の通りである。

【0138】

クローン	解離定数 (M)
G1-181	1.09×10^{-8}
G2-10	9.90×10^{-11}
G2-25	1.51×10^{-10}

抗体の親和性を検討するにはBiacoreによる感度測定による方法が現在のところ最も信頼できるが、この際の解離定数は単位時間当たりに結合する抗体の結合速度定数を結合し

た抗体の解離定数で割った数値として便宜的に算出される。抗体の活性はこのペプチドに対する親和性に加えて、抗体がどれだけ短時間で抗原に結合しうるかも重要な要素である。生体内でできるだけ速やかにウイルスと結合し、その結果ウイルス抗原の分子構造に変化を加えて、一層強固な結合状態に入ることも期待できる。G1-181クローンは解離定数算出ではそれほど高いとはいえないものの、結合定数のプロファイルでは最も急速に多くの抗原分子と結合するという点で優れている。

【0139】

通常、モノクローナル抗体作製のために用いるBalb/c マウスから得られた抗体は、解離定数KD= $4.97 \times 10^{-6} \sim 5.68 \times 10^{-9}$ (M) で、低親和性でかつ少数の抗体しか得ることができず、陰性コントロールの野生型 (WT) マウスにおいても、解離定数KD= $2.81 \times 10^{-5} \sim 3.11 \times 10^{-9}$ (M) の範囲までしか得られず、限界があった。

【0140】

これらに対して、GANPトランスジェニック (Tg) マウスにおいては、解離定数KD= 9.90×10^{-11} (M) という高親和性抗体 (G2-10) を得ることができ、この親和性は、Balb/c マウスのクローンの57倍、野生型 (WT) マウスの31倍も高親和性であるといえる。

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】B細胞におけるGANPの発現の増加を示す図である。

【図2】ELISAを用いて各抗体によるgp120(308-330)ペプチドを検出した結果を示す図である。

【図3】各クローンの解離定数を測定した結果を示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0142】

配列番号7：プライマー

配列番号8：プライマー

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology & Industry Foundation

<120> anti-HIV antibody

<130> P03-0180

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 6429

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (384)..(6299)

<400> 1

gttgcgggtgc ggtgggccccg gtagaggctg cacgcagact gtggcgagc acaagcgctg 60

gcgacagtgg ccgtatctgg cggacttgct cctccctccg cggcctccgc tgtcccttgt 120

gtcttgccg agttgctgaa ggccttcact agtctcgct cgaaggcgtc tgttaaccta 180

gcggccggct tccggagtgt taagcatcggt ggataaaaaag ctattatttc tagaccaggg 240

catcgcaagt tcgagttacc gggagaaaaaa tgagatggtc atcctgagga tgaaggagag 300

cttcccctgg caacagataa tttaaagagg agagctactt gtgtatagtc catatttt 360

gccttcagat aattggcttg aag atg cac ccg gtg aac ccc ttc gga ggc agc 413

Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser

1 5 10

agc cca agt gct ttt gcg gta tct tcc agc acc acg gga aca tat cag 461

Ser Pro Ser Ala Phe Ala Val Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln

15 20 25

act aaa tca cca ttt cga ttt ggc cag cct tcc ctt ttt gga cag aac 509

Thr Lys Ser Pro Phe Arg Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn

30 35 40

agc aca ccc agc aag agc ctg gcg ttt tca caa gta cca agc ttt gca 557

Ser Thr Pro Ser Lys Ser Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala

45	50	55	
aca ccc tct gga gga agc cat tct tcc tcc ttg cca gca ttt gga ctc Thr Pro Ser Gly Gly Ser His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu			605
60 65 70			
acc caa acc tca agt gtg gga ctc ttc tct agt ctc gaa tcc aca cct Thr Gln Thr Ser Ser Val Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro			653
75 80 85 90			
tct ttc gca gct act tcg agt tcc tct gtg ccc ggc aat acg gca ttc Ser Phe Ala Ala Thr Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe			701
95 100 105			
agc ttt aag tca acc tct agc gtt ggg gtt ttc cca agt ggc gct act Ser Phe Lys Ser Thr Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr			749
110 115 120			
ttt ggg cca gaa acc gga gaa gta gca ggt tct ggc ttt cgg aag acg Phe Gly Pro Glu Thr Gly Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr			797
125 130 135			
gaa ttc aag ttt aaa cct ctg gaa aat gca gtc ttc aaa ccg ata ccg Glu Phe Lys Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro			845
140 145 150			
ggg cct gag tca gag cca gaa aaa acc cag agc cag att tct tct gga Gly Pro Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly			893
155 160 165 170			
ttt ttt aca ttt tcc cat ccc gtt ggt agc ggg tct gga ggc ctg acc Phe Phe Thr Phe Ser His Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr			941
175 180 185			
cct ttt tct ttc cca cag gtg aca aat agt tcg gtg act agc tca agt Pro Phe Ser Phe Pro Gln Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser			989
190 195 200			
ttt atc ttt tcg aaa cca gtt act agt aat act cct gcc ttt gcc tct Phe Ile Phe Ser Lys Pro Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser			1037
205 210 215			
cct ttg tct aac caa aat gta gaa gaa gag aag agg gtt tct acg tca Pro Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser			1085
220 225 230			
gcg ttt gga agc tca aac agt agc ttc agt act ttc ccc aca gcg tca Ala Phe Gly Ser Ser Asn Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser			1133
235 240 245 250			

cca gga tct ttg ggg gag ccc ttc cca gct aac aaa cca agc ctc cgc Pro Gly Ser Leu Gly Glu Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg 255 260 265	1181
caa gga tgt gag gaa gcc atc tcc cag gtg gag cca ctt ccc acc ctc Gln Gly Cys Glu Glu Ala Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu 270 275 280	1229
atg aag gga tta aag agg aaa gag gac cag gat cgc tcc ccg agg aga Met Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg 285 290 295	1277
cat tgc cac gag gca gca gaa gac cct gat ccc ctg tcc agg ggc gac His Cys His Glu Ala Ala Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp 300 305 310	1325
cat ccc cca gat aaa cggtt cca gtc cgc ctc aac aga ccc cggtt gga ggt His Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly 315 320 325 330	1373
act ttg ttt ggc cggtt aca ata cag gag gtc ttc aaa agc aat aaa gag Thr Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu 335 340 345	1421
gca ggc cgc ctg ggc agc aag gaa tcc aag gag agt ggc ttt gcg gaa Ala Gly Arg Leu Gly Ser Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu 350 355 360	1469
cct ggg gaa agt gac cac gctt cca gct gtt act aaa gag gaa gaa agt Pro Gly Glu Ser Asp His Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr 365 370 375	1517
atg gta cct tcc cgc ctt cca gct gtg act aaa gag gaa gaa gaa agt Met Val Pro Ser Arg Leu Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Ser 380 385 390	1565
aga gat gag aaa gaa gat tct ctc agg gga aag tct gtg cgc cag agt Arg Asp Glu Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser 395 400 405 410	1613
aag cga agg gaa gag tgg atc tac agc ctc ggg ggc gtg tct tct tta Lys Arg Arg Glu Glu Trp Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu 415 420 425	1661
gag ctc aca gcc atc cag tgc aag aac atc ccc gac tac ctc aac gac Glu Leu Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp 430 435 440	1709
aga gcc atc ctg gag aaa cac ttc agc aaa atc gct aaa gtc cag cggtt Arg Ala Ile Leu Glu Lys His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg	1757

445	450	455	
gtc ttc acc aga cgc agc aag aag ctc gcc gtg att cat ttt ttc gac Val Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp 460	465	470	1805
cac gca tcg gca gcc ctg gct agg aag aag ggg aaa ggt ctg cat aag His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys 475	480	485	1853
gac gtg gtt atc ttt tgg cac aag aag aaa ata agt ccc agc aag aaa Asp Val Val Ile Phe Trp His Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys 495	500	505	1901
ctc ttt ccc ctg aag gag aag ctt ggt gag agt gaa gcc agc cag ggc Leu Phe Pro Leu Lys Glu Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly 510	515	520	1949
atc gag gac tcc ccc ttt cag cac tcg cct ctc agc aag ccc atc gtg Ile Glu Asp Ser Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val 525	530	535	1997
agg cct gca gcc ggc agc ctc ctc agc aaa agc tct cca gtg aag aag Arg Pro Ala Ala Gly Ser Leu Leu Ser Lys Ser Pro Val Lys Lys 540	545	550	2045
ccg agt ctt ctg aag atg cac cag ttt gag gcg gat cct ttt gac tct Pro Ser Leu Leu Lys Met His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser 555	560	565	2093
gga tct gag ggc tcc gag ggc ctt ggt tct tgc gtg tca tct ctt agc Gly Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser 575	580	585	2141
acc ctg ata ggg act gtg gca gac aca tct gag gag aag tac cgc ctt Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu 590	595	600	2189
ctg gac cag aga gac cgc atc atg cgg caa gct cga gtg aag agg acg Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr 605	610	615	2237
gac ctg gac aaa gcc agg gca ttt gtt ggg act tgc cct gac atg tgt Asp Leu Asp Lys Ala Arg Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys 620	625	630	2285
ccc gag aag gag cgg tac ttg agg gag acc cgg agc cag ctg agc gtg Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val 635	640	645	2333

ttt gaa gtt gtc cca ggg act gac cag gtg gac cat gca gca gcc gtg Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala Val 655 660 665	2381
aag gag tac agc cggtcc tct gca gat cag gag gag ccc ctg cca cat Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His 670 675 680	2429
gag ctg aga ccc tca gca gtt ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg Glu Leu Arg Pro Ser Ala Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val 685 690 695	2477
acc cag atc atg gac caa aag gaa ggc agc ctt cggtat gat tgg tat gac Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp 700 705 710	2525
ttc gtg tgg aac cgc acc cggtata cggt aag gac ata aca cag cag Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln 715 720 725 730	2573
cac ctc tgt gat ccc ctg acg gtg tct ctg atc gag aag tgt acc cga His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg 735 740 745	2621
ttt cac att cac tgt gcc cac ttt atg tgt gag gag cct atg tct tcc Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser 750 755 760	2669
ttt gat gcc aag atc aac aat gag aac atg acc aag tgt cta cag agt Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser 765 770 775	2717
ctg aag gag atg tac cag gac ctg agg aac aag ggt gtt ttt tgt gcc Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala 780 785 790	2765
agt gaa gca gag ttt cag ggc tac aat gtc ctg ctt aat ctc aac aaa Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys 795 800 805 810	2813
gga gac att ttg aga gaa gtg cag cag ttc cac cct gac gtt agg aac Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn 815 820 825	2861
tcc cca gag gtg aac ttc gct gtc cag gct ttt gct gca ttg aac agc Ser Pro Glu Val Asn Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser 830 835 840	2909
aat aat ttt gtg aga ttt ttc aaa ctg gtt cag tca gct tct tac ctg Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu	2957

agc ctt ctc	cag gcc tcc acg cag	cct gag gtg ctg ctt	cca aag	3569
Ser Leu Leu	Gln Ala Ser Thr Gln	Pro Glu Val Leu Leu	Pro Lys	
1050	1055	1060		
cct gcg cct	gtg tac tct gac tcg	gac ctg gta cag gtg	gtg gac	3614
Pro Ala Pro	Val Tyr Ser Asp Ser	Asp Leu Val Gln Val	Val Asp	
1065	1070	1075		
gag ctc atc	cag gag gct ctg caa	gtg gac tgt gag gaa	gtc agc	3659
Glu Leu Ile	Gln Glu Ala Leu Gln	Val Asp Cys Glu Glu	Val Ser	
1080	1085	1090		
tcc gct ggg	gca gcc tac gta gcc	gca gct ctg ggc gtt	tcc aat	3704
Ser Ala Gly	Ala Ala Tyr Val Ala	Ala Ala Leu Gly Val	Ser Asn	
1095	1100	1105		
gct gct gtg	gag gat ctg att act	gct gcg acc acg ggc	att ctg	3749
Ala Ala Val	Glu Asp Leu Ile Thr	Ala Ala Thr Thr Gly	Ile Leu	
1110	1115	1120		
agg cac gtt	gcc gct gag gaa gtt	tcc atg gaa agg cag	aga cta	3794
Arg His Val	Ala Ala Glu Glu Val	Ser Met Glu Arg Gln	Arg Leu	
1125	1130	1135		
gag gaa gag	aag caa cga gct gag	gag gaa cgg ttg aag	caa gag	3839
Glu Glu Glu	Lys Gln Arg Ala Glu	Glu Glu Arg Leu Lys	Gln Glu	
1140	1145	1150		
aga gaa ctg	atg tta act cag ctg	agc gag ggt ctg gcc	gca gag	3884
Arg Glu Leu	Met Leu Thr Gln Leu	Ser Glu Gly Leu Ala	Ala Glu	
1155	1160	1165		
ctg aca gaa	ctc acg gtg aca gag	tgt gtg tgg gaa acc	tgc tct	3929
Leu Thr Glu	Leu Thr Val Thr Glu	Cys Val Trp Glu Thr	Cys Ser	
1170	1175	1180		
cag gag cta	cag agt gca gta aaa	ata gac cag aag gtc	cgt gtg	3974
Gln Glu Leu	Gln Ser Ala Val Lys	Ile Asp Gln Lys Val	Arg Val	
1185	1190	1195		
gcc cgc tgt	tgt gaa gcc gtc tgt	gca cac ctg gtg gat	ttg ttt	4019
Ala Arg Cys	Cys Glu Ala Val Cys	Ala His Leu Val Asp	Leu Phe	
1200	1205	1210		
ctt gct gag	gaa att ttc cag act	gca aaa gag aca ctc	cag gaa	4064
Leu Ala Glu	Glu Ile Phe Gln Thr	Ala Lys Glu Thr Leu	Gln Glu	
1215	1220	1225		
ctc cag tgt	ttc tgc aag tat cta	caa cgg tgg agg gag	gct gtt	4109
Leu Gln Cys	Phe Cys Lys Tyr Leu	Gln Arg Trp Arg Glu	Ala Val	

1230	1235	1240	
gca gct cgg aag aaa ttc cgg cgt Ala Ala Arg Lys Lys Phe Arg Arg	cag atg cgg gcc ttc cct gca Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala		4154
1245	1250	1255	
gcg cca tgc tgt gtg gat gtg aat Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Asn	gac cgg ctg cag gca cta gtg Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val		4199
1260	1265	1270	
ccc agc gca gag tgc ccc att act Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Thr	gag gag aac ctg gcc aag ggt Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly		4244
1275	1280	1285	
ctt ttg gac ctg ggc cac gca ggc Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly	aaa gta ggc gtc tcc tgt acc Lys Val Gly Val Ser Cys Thr		4289
1290	1295	1300	
agg ttg agg cgg ctt aga aac aag Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys	aca gct cac cag ata aag gtc Thr Ala His Gln Ile Lys Val		4334
1305	1310	1315	
cag cac ttc cac cag cag ctg ctg Gln His Phe His Gln Gln Leu Leu	agg aat gct gca tgg gca cct Arg Asn Ala Ala Trp Ala Pro		4379
1320	1325	1330	
ctg gac ctg cca tcc att gtg tct Leu Asp Leu Pro Ser Ile Val Ser	gag cac ctc ccc atg aag cag Glu His Leu Pro Met Lys Gln		4424
1335	1340	1345	
aag cga agg ttt tgg aaa ctg gtg Lys Arg Arg Phe Trp Lys Leu Val	ctg gtg ttg cct gat gtg gaa Leu Val Leu Pro Asp Val Glu		4469
1350	1355	1360	
gag cag act cca gag agt cct ggc Glu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Gly	aga ata cta gaa aac tgg cta Arg Ile Leu Glu Asn Trp Leu		4514
1365	1370	1375	
aag gtc aaa ttc aca gga gat gac Lys Val Lys Phe Thr Gly Asp Asp	agc atg gtg ggt gac ata gga Ser Met Val Gly Asp Ile Gly		4559
1380	1385	1390	
gat aat gct ggt gat atc cag acc Asp Asn Ala Gly Asp Ile Gln Thr	ctc tca gtc ttt aat aca ctt Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu		4604
1395	1400	1405	
agt agt aaa ggg gat caa aca gtt Ser Ser Lys Gly Asp Gln Thr Val	tct gtc aac gtg tgt ata aag Ser Val Asn Val Cys Ile Lys		4649
1410	1415	1420	

gtg gct cat	ggc acc ctt agt gac	agt gcc ctt gat gct	gtg gag	4694
Val Ala His	Gly Thr Leu Ser Asp	Ser Ala Leu Asp Ala	Val Glu	
1425	1430	1435		
acc cag aag	gac ctg ttg gga acc	agt ggg ctc atg ctg	ctg ctt	4739
Thr Gln Lys	Asp Leu Leu Gly Thr	Ser Gly Leu Met Leu	Leu Leu	
1440	1445	1450		
ccc ccg aaa	gtg aag agt gag gag	gtg gca gag gag gaa	ctg tcc	4784
Pro Pro Lys	Val Lys Ser Glu Glu	Val Ala Glu Glu Glu	Leu Ser	
1455	1460	1465		
tgg ctg tcg	gct tta ctg cag ctc	aag cag ctt ctg cag	gcc aag	4829
Trp Leu Ser	Ala Leu Leu Gln Leu	Lys Gln Leu Leu Gln	Ala Lys	
1470	1475	1480		
ccc ttc cag	cct gcc ctg ccg ctg	gtg gtc ctc gtg ccc	agc tcc	4874
Pro Phe Gln	Pro Ala Leu Pro Leu	Val Val Leu Val Pro	Ser Ser	
1485	1490	1495		
aga ggg gac	tcc gcg ggg agg gca	gta gag gac ggt ctg	atg tta	4919
Arg Gly Asp	Ser Ala Gly Arg Ala	Val Glu Asp Gly Leu	Met Leu	
1500	1505	1510		
cag gat ttg	gtt tca gcc aag ctg	att tcc gat tac att	gtt gtt	4964
Gln Asp Leu	Val Ser Ala Lys Leu	Ile Ser Asp Tyr Ile	Val Val	
1515	1520	1525		
gag att cct	gac tct gtt aat gat	tta caa ggc aca gtg	aag gtt	5009
Glu Ile Pro	Asp Ser Val Asn Asp	Leu Gln Gly Thr Val	Lys Val	
1530	1535	1540		
tct gga gca	gtc cag tgg ctg atc	tcc gga tgt cct caa	gcc cta	5054
Ser Gly Ala	Val Gln Trp Leu Ile	Ser Gly Cys Pro Gln	Ala Leu	
1545	1550	1555		
gac ctt tgc	tgc cag acc ctt gtt	cag tat gtt gag gat	ggg atc	5099
Asp Leu Cys	Cys Gln Thr Leu Val	Gln Tyr Val Glu Asp	Gly Ile	
1560	1565	1570		
agc cgc gag	ttc agc cgt cggttt	ttc cac gac agg aga	gag agg	5144
Ser Arg Glu	Phe Ser Arg Arg Phe	Phe His Asp Arg Arg	Glu Arg	
1575	1580	1585		
cgc ctg gct	agc ctg ccc tcc cag	gag cct agc acc att	att gag	5189
Arg Leu Ala	Ser Leu Pro Ser Gln	Glu Pro Ser Thr Ile	Ile Glu	
1590	1595	1600		
ttg ttc aac	agt gtg ctg cag ttc	ctg gcc tct gtg gta	tcc tct	5234
Leu Phe Asn	Ser Val Leu Gln Phe	Leu Ala Ser Val Val	Ser Ser	

1605	1610	1615	
gag cag ctg tgt gac atc tcc tgg cct gtc atg gaa ttt gcc gaa Glu Gln Leu Cys Asp Ile Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu			5279
1620	1625	1630	
gtg gga ggc agc cag ctg ctt cct cac ctg cac tgg aac tca cca Val Gly Gly Ser Gln Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro			5324
1635	1640	1645	
gag cat cta gcg tgg ctg aaa caa gct gtg ctt ggg ttc cag ctt Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu			5369
1650	1655	1660	
cca cag atg gac ctt cca ccc cca ggg gcc ccc tgg ctc cct gtg Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val			5414
1665	1670	1675	
tgt tcc atg gtc att cag tac acc tcc cag att ccc agc tca agc Cys Ser Met Val Ile Gln Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser			5459
1680	1685	1690	
cag aca cag cct gtc ctc cag tcc cag gcg gag aac ctg ctg tgc Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys			5504
1695	1700	1705	
aga aca tac cag aag tgg aag aac aag agc ctc tct cca ggc cag Arg Thr Tyr Gln Lys Trp Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln			5549
1710	1715	1720	
gag ttg ggg cct tct gtt gcc gag atc ccg tgg gat gac atc atc Glu Leu Gly Pro Ser Val Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile			5594
1725	1730	1735	
acc tta tgc atc aat cat aag ctg agg gac tgg aca ccc ccc agg Thr Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg			5639
1740	1745	1750	
ctc cct gtc aca tta gag gcg ctg agt gaa gat ggt caa ata tgt Leu Pro Val Thr Leu Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys			5684
1755	1760	1765	
gtg tat ttt ttc aaa aac ctt tta aga aaa tac cac gtt ccc tcg Val Tyr Phe Phe Lys Asn Leu Leu Arg Lys Tyr His Val Pro Ser			5729
1770	1775	1780	
tca tgg gaa cag gcc aga atg cag acg cag cgg gaa ctg cag ctg Ser Trp Glu Gln Ala Arg Met Gln Thr Gln Arg Glu Leu Gln Leu			5774
1785	1790	1795	

agt cat gga cgt tcg ggg atg agg tcc atc cat cct cct aca agc	5819
Ser His Gly Arg Ser Gly Met Arg Ser Ile His Pro Pro Thr Ser	
1800 1805 1810	
act ttt cct act cca ttg ctt cat gta cac cag aaa ggg aag aaa	5864
Thr Phe Pro Thr Pro Leu Leu His Val His Gln Lys Gly Lys Lys	
1815 1820 1825	
aag gaa gag agt ggc cga gag ggg agc ctc agt aca gag gac ctc	5909
Lys Glu Glu Ser Gly Arg Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu Asp Leu	
1830 1835 1840	
ctg cgg ggg gct tct gca gaa gag ctc ctg gca cag agt ctg tcc	5954
Leu Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu Ser	
1845 1850 1855	
agc agt ctt ctg gaa gag aag gaa gag aac aag agg ttt gaa gat	5999
Ser Ser Leu Leu Glu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp	
1860 1865 1870	
caa ctt cag cag tgg tta tcg caa gac tca cag gca ttc aca gag	6044
Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu	
1875 1880 1885	
tca act cggtt cct ctc tac ctc cct cag acg cta gtg tcc ttt	6089
Ser Thr Arg Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe	
1890 1895 1900	
cct gat tct atc aaa act cag acc atg gtg aaa aca tct aca agt	6134
Pro Asp Ser Ile Lys Thr Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser	
1905 1910 1915	
cct cag aat tca gga aca gga aag cag ttg agg ttc tca gag gca	6179
Pro Gln Asn Ser Gly Thr Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala	
1920 1925 1930	
tcc ggt tca tcc ctg acg gaa aag ctg aag ctc ctg gaa agg ctg	6224
Ser Gly Ser Ser Leu Thr Glu Lys Leu Lys Leu Glu Arg Leu	
1935 1940 1945	
atc cag agc tca agg gcg gaa gaa gca gcc tcc gag ctg cac ctc	6269
Ile Gln Ser Ser Arg Ala Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu	
1950 1955 1960	
tct gca ctg ctg gag atg gtg gac atg tag ctgtctgacg ggagacggat	6319
Ser Ala Leu Leu Glu Met Val Asp Met	
1965 1970	
ctctaattca taatgctttg tctgtattca attgtgttat agatgctgtt ggaaatgtga	6379

ctattaatta tgcaaataaa cttttgaat cattccaaaa aaaaaaccat 6429

<210> 2

<211> 1971

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met His Pro Val Asn Pro Phe Gly Gly Ser Ser Pro Ser Ala Phe Ala
1 5 10 15

Val Ser Ser Ser Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Thr Lys Ser Pro Phe Arg
20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Pro Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Ala Phe Ser Gln Val Pro Ser Phe Ala Thr Pro Ser Gly Gly Ser
50 55 60

His Ser Ser Ser Leu Pro Ala Phe Gly Leu Thr Gln Thr Ser Ser Val
65 70 75 80

Gly Leu Phe Ser Ser Leu Glu Ser Thr Pro Ser Phe Ala Ala Thr Ser
85 90 95

Ser Ser Ser Val Pro Gly Asn Thr Ala Phe Ser Phe Lys Ser Thr Ser
100 105 110

Ser Val Gly Val Phe Pro Ser Gly Ala Thr Phe Gly Pro Glu Thr Gly
115 120 125

Glu Val Ala Gly Ser Gly Phe Arg Lys Thr Glu Phe Lys Phe Lys Pro
130 135 140

Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Pro Gly Pro Glu Ser Glu Pro
145 150 155 160

Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ser Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ser His
165 170 175

Pro Val Gly Ser Gly Ser Gly Leu Thr Pro Phe Ser Phe Pro Gln
180 185 190

Val Thr Asn Ser Ser Val Thr Ser Ser Ser Phe Ile Phe Ser Lys Pro
195 200 205

Val Thr Ser Asn Thr Pro Ala Phe Ala Ser Pro Leu Ser Asn Gln Asn
210 215 220

Val Glu Glu Glu Lys Arg Val Ser Thr Ser Ala Phe Gly Ser Ser Asn
225 230 235 240

Ser Ser Phe Ser Thr Phe Pro Thr Ala Ser Pro Gly Ser Leu Gly Glu
245 250 255

Pro Phe Pro Ala Asn Lys Pro Ser Leu Arg Gln Gly Cys Glu Glu Ala
260 265 270

Ile Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Thr Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg
275 280 285

Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Cys His Glu Ala Ala
290 295 300

Glu Asp Pro Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg
305 310 315 320

Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr
325 330 335

Ile Gln Glu Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Ala Gly Arg Leu Gly Ser
340 345 350

Lys Glu Ser Lys Glu Ser Gly Phe Ala Glu Pro Gly Glu Ser Asp His
355 360 365

Ala Ala Val Pro Gly Gly Ser Gln Ser Thr Met Val Pro Ser Arg Leu
 370 375 380

Pro Ala Val Thr Lys Glu Glu Glu Ser Arg Asp Glu Lys Glu Asp
 385 390 395 400

Ser Leu Arg Gly Lys Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Arg Glu Glu Trp
 405 410 415

Ile Tyr Ser Leu Gly Gly Val Ser Ser Leu Glu Leu Thr Ala Ile Gln
 420 425 430

Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Ala Ile Leu Glu Lys
 435 440 445

His Phe Ser Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Val Phe Thr Arg Arg Ser
 450 455 460

Lys Lys Leu Ala Val Ile His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu
 465 470 475 480

Ala Arg Lys Lys Gly Lys Gly Leu His Lys Asp Val Val Ile Phe Trp
 485 490 495

His Lys Lys Lys Ile Ser Pro Ser Lys Lys Leu Phe Pro Leu Lys Glu
 500 505 510

Lys Leu Gly Glu Ser Glu Ala Ser Gln Gly Ile Glu Asp Ser Pro Phe
 515 520 525

Gln His Ser Pro Leu Ser Lys Pro Ile Val Arg Pro Ala Ala Gly Ser
 530 535 540

Leu Leu Ser Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys Met
 545 550 555 560

His Gln Phe Glu Ala Asp Pro Phe Asp Ser Gly Ser Glu Gly Ser Glu
 565 570 575

Gly Leu Gly Ser Cys Val Ser Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val
 580 585 590

Ala Asp Thr Ser Glu Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg
 595 600 605

Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg
 610 615 620

Ala Phe Val Gly Thr Cys Pro Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr
 625 630 635 640

Leu Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro Gly
 645 650 655

Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser
 660 665 670

Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Ser Ala
 675 680 685

Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp Gln
 690 695 700

Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr
 705 710 715 720

Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro Leu
 725 730 735

Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys Ala
 740 745 750

His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn
 755 760 765

Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln
 770 775 780

Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln
 785 790 795 800

Gly Tyr Asn Val Leu Leu Asn Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu
 805 810 815

Val Gln Gln Phe His Pro Asp Val Arg Asn Ser Pro Glu Val Asn Phe
 820 825 830

Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe
 835 840 845

Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu His
 850 855 860

Cys Tyr Phe Asn Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn Val
 865 870 875 880

Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Val Phe Pro Leu Asp Gly
 885 890 895

Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Ser Glu Glu Ala Thr Asn Phe
 900 905 910

Leu Asn Tyr His Gly Leu Thr Val Ala Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn
 915 920 925

Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Cys Lys Ala Arg Lys Ser
 930 935 940

Val Phe Ile Gly Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Val Val Asn
 945 950 955 960

Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser Phe
965 970 975

Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Val Gly Glu Ser Leu Ala Thr Glu Leu Pro
980 985 990

Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gly Gly Asp Pro Ala Gly Gly Gly Arg Gly
995 1000 1005

Glu Asp Cys Glu Ala Glu Val Asp Leu Pro Thr Leu Ala Val Leu
1010 1015 1020

Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ser Ala Thr Pro Ala Leu His Val
1025 1030 1035

Gln Pro Leu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Gln Ala Ser
1040 1045 1050

Thr Gln Pro Glu Val Leu Leu Pro Lys Pro Ala Pro Val Tyr Ser
1055 1060 1065

Asp Ser Asp Leu Val Gln Val Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala
1070 1075 1080

Leu Gln Val Asp Cys Glu Glu Val Ser Ser Ala Gly Ala Ala Tyr
1085 1090 1095

Val Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Asn Ala Ala Val Glu Asp Leu
1100 1105 1110

Ile Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ile Leu Arg His Val Ala Ala Glu
1115 1120 1125

Glu Val Ser Met Glu Arg Gln Arg Leu Glu Glu Glu Lys Gln Arg
1130 1135 1140

Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys Gln Glu Arg Glu Leu Met Leu Thr
1145 1150 1155

Gln Leu Ser Glu Gly Leu Ala Ala Glu Leu Thr Glu Leu Thr Val
1160 1165 1170

Thr Glu Cys Val Trp Glu Thr Cys Ser Gln Glu Leu Gln Ser Ala
1175 1180 1185

Val Lys Ile Asp Gln Lys Val Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Ala
1190 1195 1200

Val Cys Ala His Leu Val Asp Leu Phe Leu Ala Glu Glu Ile Phe
1205 1210 1215

Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys
1220 1225 1230

Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Phe
1235 1240 1245

Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp
1250 1255 1260

Val Asn Asp Arg Leu Gln Ala Leu Val Pro Ser Ala Glu Cys Pro
1265 1270 1275

Ile Thr Glu Glu Asn Leu Ala Lys Gly Leu Leu Asp Leu Gly His
1280 1285 1290

Ala Gly Lys Val Gly Val Ser Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg
1295 1300 1305

Asn Lys Thr Ala His Gln Ile Lys Val Gln His Phe His Gln Gln
1310 1315 1320

Leu Leu Arg Asn Ala Ala Trp Ala Pro Leu Asp Leu Pro Ser Ile
1325 1330 1335

Val Ser Glu His Leu Pro Met Lys Gln Lys Arg Arg Phe Trp Lys
 1340 1345 1350

Leu Val Leu Val Leu Pro Asp Val Glu Glu Gln Thr Pro Glu Ser
 1355 1360 1365

Pro Gly Arg Ile Leu Glu Asn Trp Leu Lys Val Lys Phe Thr Gly
 1370 1375 1380

Asp Asp Ser Met Val Gly Asp Ile Gly Asp Asn Ala Gly Asp Ile
 1385 1390 1395

Gln Thr Leu Ser Val Phe Asn Thr Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln
 1400 1405 1410

Thr Val Ser Val Asn Val Cys Ile Lys Val Ala His Gly Thr Leu
 1415 1420 1425

Ser Asp Ser Ala Leu Asp Ala Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu
 1430 1435 1440

Gly Thr Ser Gly Leu Met Leu Leu Leu Pro Pro Lys Val Lys Ser
 1445 1450 1455

Glu Glu Val Ala Glu Glu Glu Leu Ser Trp Leu Ser Ala Leu Leu
 1460 1465 1470

Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu
 1475 1480 1485

Pro Leu Val Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly Asp Ser Ala Gly
 1490 1495 1500

Arg Ala Val Glu Asp Gly Leu Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala
 1505 1510 1515

Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Ile Val Val Glu Ile Pro Asp Ser Val
 1520 1525 1530

Asn Asp Leu Gln Gly Thr Val Lys Val Ser Gly Ala Val Gln Trp
 1535 1540 1545

Leu Ile Ser Gly Cys Pro Gln Ala Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr
 1550 1555 1560

Leu Val Gln Tyr Val Glu Asp Gly Ile Ser Arg Glu Phe Ser Arg
 1565 1570 1575

Arg Phe Phe His Asp Arg Arg Glu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Pro
 1580 1585 1590

Ser Gln Glu Pro Ser Thr Ile Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu
 1595 1600 1605

Gln Phe Leu Ala Ser Val Val Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Ile
 1610 1615 1620

Ser Trp Pro Val Met Glu Phe Ala Glu Val Gly Gly Ser Gln Leu
 1625 1630 1635

Leu Pro His Leu His Trp Asn Ser Pro Glu His Leu Ala Trp Leu
 1640 1645 1650

Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro
 1655 1660 1665

Pro Pro Gly Ala Pro Trp Leu Pro Val Cys Ser Met Val Ile Gln
 1670 1675 1680

Tyr Thr Ser Gln Ile Pro Ser Ser Ser Gln Thr Gln Pro Val Leu
 1685 1690 1695

Gln Ser Gln Ala Glu Asn Leu Leu Cys Arg Thr Tyr Gln Lys Trp
 1700 1705 1710

Lys Asn Lys Ser Leu Ser Pro Gly Gln Glu Leu Gly Pro Ser Val
1715 1720 1725

Ala Glu Ile Pro Trp Asp Asp Ile Ile Thr Leu Cys Ile Asn His
1730 1735 1740

Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro Pro Arg Leu Pro Val Thr Leu Glu
1745 1750 1755

Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn
1760 1765 1770

Leu Leu Arg Lys Tyr His Val Pro Ser Ser Trp Glu Gln Ala Arg
1775 1780 1785

Met Gln Thr Gln Arg Glu Leu Gln Leu Ser His Gly Arg Ser Gly
1790 1795 1800

Met Arg Ser Ile His Pro Pro Thr Ser Thr Phe Pro Thr Pro Leu
1805 1810 1815

Leu His Val His Gln Lys Gly Lys Lys Lys Glu Glu Ser Gly Arg
1820 1825 1830

Glu Gly Ser Leu Ser Thr Glu Asp Leu Leu Arg Gly Ala Ser Ala
1835 1840 1845

Glu Glu Leu Leu Ala Gln Ser Leu Ser Ser Ser Leu Leu Glu Glu
1850 1855 1860

Lys Glu Glu Asn Lys Arg Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu
1865 1870 1875

Ser Gln Asp Ser Gln Ala Phe Thr Glu Ser Thr Arg Leu Pro Leu
1880 1885 1890

Tyr Leu Pro Gln Thr Leu Val Ser Phe Pro Asp Ser Ile Lys Thr
1895 1900 1905

Gln Thr Met Val Lys Thr Ser Thr Ser Pro Gln Asn Ser Gly Thr
 1910 1915 1920

Gly Lys Gln Leu Arg Phe Ser Glu Ala Ser Gly Ser Ser Leu Thr
 1925 1930 1935

Glu Lys Leu Lys Leu Leu Glu Arg Leu Ile Gln Ser Ser Arg Ala
 1940 1945 1950

Glu Glu Ala Ala Ser Glu Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Glu Met
 1955 1960 1965

Val Asp Met
 1970

<210> 3
 <211> 6114
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (38)..(5977)

<400> 3
 gtaatactta attacttct aataattgga gcagaag atg aac cca act aat cct 55
 Met Asn Pro Thr Asn Pro
 1 5

ttc agt ggg cag cag cct agt gct ttt tcg gcg tct tct agt aat gta 103
 Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser Ala Ser Ser Asn Val
 10 15 20

gga aca ctt cca tct aag ccg cca ttt cga ttt ggt caa cct tct ctt 151
 Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg Phe Gly Gln Pro Ser Leu
 25 30 35

ttt gga caa aac agt acc tta tct ggg aag agc tcg gga ttt tca cag 199
 Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys Ser Ser Gly Phe Ser Gln
 40 45 50

gta tcc agc ttt cca gcg tct tct gga gta agt cat tcc tct tca gtg 247

Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	His	Ser	Ser	Ser	Val	
55					60				65						70	
caa	aca	tta	ggg	ttc	acc	caa	acc	tca	agt	gtt	gga	ccc	ttt	tct	gga	295
Gln	Thr	Leu	Gly	Phe	Thr	Gln	Thr	Ser	Ser	Val	Gly	Pro	Phe	Ser	Gly	
					75				80						85	
ctt	gag	cac	act	tcc	acc	ttt	gtg	gct	acc	tct	ggg	cct	tca	agt	tca	343
Leu	Glu	His	Thr	Ser	Thr	Phe	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	
					90				95						100	
tct	gtg	ctg	gga	aac	aca	gga	ttt	agt	ttt	aaa	tca	ccc	acc	agt	gtt	391
Ser	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Gly	Phe	Ser	Phe	Lys	Ser	Pro	Thr	Ser	Val	
					105				110						115	
ggg	gct	ttc	cca	agc	act	tct	gct	ttt	gga	caa	gaa	gct	gga	gaa	ata	439
Gly	Ala	Phe	Pro	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Glu	Ile	
					120				125						130	
gtg	aac	tct	ggt	ttt	ggg	aaa	aca	gaa	ttc	agc	ttt	aaa	cct	ctg	gaa	487
Val	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Lys	Thr	Glu	Phe	Ser	Phe	Lys	Pro	Leu	Glu	
					135				140						150	
aat	gca	gtg	ttc	aaa	cca	ata	ctg	ggg	gct	gaa	tct	gag	cca	gag	aaa	535
Asn	Ala	Val	Phe	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Ala	Glu	Ser	Glu	Pro	Glu	Lys	
					155				160						165	
acc	cag	agc	caa	att	gct	tct	ggg	ttt	ttt	aca	ttt	tcc	cac	cca	att	583
Thr	Gln	Ser	Gln	Ile	Ala	Ser	Gly	Phe	Phe	Thr	Phe	Ser	His	Pro	Ile	
					170				175						180	
agt	agt	gca	cct	gga	ggc	ctg	gcc	cct	ttc	tct	ttt	cct	caa	gta	aca	631
Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Phe	Ser	Phe	Pro	Gln	Val	Thr	
					185				190						195	
agt	agt	tca	gct	acc	act	tca	aat	ttt	acc	ttt	tca	aaa	cct	gtt	agt	679
Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Thr	Ser	Asn	Phe	Thr	Phe	Ser	Lys	Pro	Val	Ser	
					200				205						210	
agt	aat	aat	tca	tta	tct	gcc	ttt	acc	cct	gct	ttg	tca	aac	caa	aat	727
Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Ala	Phe	Thr	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Gln	Asn	
					215				220						230	
gta	gag	gaa	gag	aag	aga	gga	cct	aag	tca	ata	ttt	gga	agt	tct	aat	775
Val	Glu	Glu	Glu	Lys	Arg	Gly	Pro	Lys	Ser	Ile	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	
					235				240						245	
aat	agc	ttc	agt	agc	ttc	cct	gta	tca	tct	gcg	gtt	ttg	ggc	gaa	cct	823
Asn	Ser	Phe	Ser	Ser	Phe	Pro	Val	Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	Pro	
					250				255						260	

ttc cag gct agc aaa gca ggt gtc agg cag ggg tgt gaa gaa gct gtt Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln Gly Cys Glu Glu Ala Val 265 270 275	871
tcc cag gtg gaa cca ctt ccc agc cta atg aaa gga ctg aaa agg aag Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met Lys Gly Leu Lys Arg Lys 280 285 290	919
gag gac cag gat cgc tcc cca agg aga cat ggc cac gag cca gca gaa Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His Gly His Glu Pro Ala Glu 295 300 305 310	967
gat tcg gat cct ctg tcc cgg ggc gat cat cct cca gac aaa cga cct Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His Pro Pro Asp Lys Arg Pro 315 320 325	1015
gtc cgc ctg aat cga ccc cgg gga ggt act tta ttt ggt cgg acg ata Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr Leu Phe Gly Arg Thr Ile 330 335 340	1063
cag gat gtt ttc aaa agc aat aag gaa gta ggt cgt ctg ggc aac aag Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val Gly Arg Leu Gly Asn Lys 345 350 355	1111
gag gcc aaa aag gaa act ggc ttt gtt gag tct gca gaa agt gac cac Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu Ser Ala Glu Ser Asp His 360 365 370	1159
atg gct atc cca gga ggg aat cag tct gtc ctg gca cct tcc cgg att Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val Leu Ala Pro Ser Arg Ile 375 380 385 390	1207
cca ggt gtg aat aaa gag gaa gaa act gaa agt aga gag aag aaa gaa Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu Ser Arg Glu Lys Lys Glu 395 400 405	1255
gat tct cta aga gga act ccg gcg cgt cag agt aac aga agc gag agc Asp Ser Leu Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gln Ser Asn Arg Ser Glu Ser 410 415 420	1303
aca gac agt ctt ggg ggc ttg tct ccc tct gaa gtc aca gcc atc cag Thr Asp Ser Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ser Glu Val Thr Ala Ile Gln 425 430 435	1351
tgc aag aac atc cct gac tac ctc aac gac agg acc att ctg gag aac Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp Arg Thr Ile Leu Glu Asn 440 445 450	1399
cat ttt ggc aaa att gct aaa gtg cag cgc atc ttt acc agg cgc agc	1447

His Phe Gly Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg Ile Phe Thr Arg Arg Ser			
455	460	465	470
aaa aag ctt gca gtg gta cat ttc ttt gat cat gca tct gca gcc ctg			1495
Lys Lys Leu Ala Val Val His Phe Phe Asp His Ala Ser Ala Ala Leu			
475	480	485	
gct aga aag aag ggg aaa agt ttg cat aaa gac atg gct atc ttt tgg			1543
Ala Arg Lys Lys Gly Lys Ser Leu His Lys Asp Met Ala Ile Phe Trp			
490	495	500	
cac agg aag aaa ata agc ccc aat aag aaa ccc ttt tcc ctg aag gag			1591
His Arg Lys Lys Ile Ser Pro Asn Lys Lys Pro Phe Ser Leu Lys Glu			
505	510	515	
aag aaa cca ggt gac ggt gaa gtc agc ccg agc aca gag gat gca ccc			1639
Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro Ser Thr Glu Asp Ala Pro			
520	525	530	
ttt cag cac tct cct ctt ggc aag gcc gca ggg agg act ggt gct agc			1687
Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala Gly Arg Thr Gly Ala Ser			
535	540	545	550
agc ctc ctg aat aaa agc tct cca gtg aag aag cca agt ctt cta aag			1735
Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys Lys Pro Ser Leu Leu Lys			
555	560	565	
gcc cac caa ttc gag gga gac tct ttt gac tca gcc tcc gag ggc tcc			1783
Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp Ser Ala Ser Glu Gly Ser			
570	575	580	
gag ggc ctc ggg cca tgt gtg ctc tcc ctc agt acc ctg ata ggc act			1831
Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ile Gly Thr			
585	590	595	
gtg gct gag aca tcc aag gag aag tac cgc ctg ctt gac cag aga gac			1879
Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg Leu Leu Asp Gln Arg Asp			
600	605	610	
agg atc atg cgg caa gct cggt gtg aag aga acc gat ctg gac aaa gcg			1927
Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg Thr Asp Leu Asp Lys Ala			
615	620	625	630
agg act ttt gtt ggc acc tgc ctg gat atg tgt cct gag aag gag agg			1975
Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met Cys Pro Glu Lys Glu Arg			
635	640	645	
tac atg cgg gag acc cgt agc cag ctg agc gtg ttc gaa gtg gtc cca			2023
Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser Val Phe Glu Val Val Pro			
650	655	660	

ggg act gac cag gtg gac cac gca gca gct gtg aaa gag tac agt cgg Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Val Lys Glu Tyr Ser Arg 665 670 675	2071
tcc tcg gcg gat cag gag gag ccc ctg ccc cac gag ctg cgg ccc ttg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro His Glu Leu Arg Pro Leu 680 685 690	2119
cca gtg ctc agc agg acc atg gac tac ctg gtg acc cag atc atg gac Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu Val Thr Gln Ile Met Asp 695 700 705 710	2167
cag aag gag ggc agc ctg cgg gat tgg tat gac ttc gtg tgg aac cgc Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr Asp Phe Val Trp Asn Arg 715 720 725	2215
acg cgt ggc ata cgg aag gat atc acg cag cag cac ctc tgt gac ccc Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln Gln His Leu Cys Asp Pro 730 735 740	2263
ctg acg gtg tcc ctg att gag aag tgc acc cgg ttt cac atc cac tgt Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr Arg Phe His Ile His Cys 745 750 755	2311
gcc cac ttc atg tgt gag gag ccc atg tcc tcc ttt gat gcc aag atc Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser Ser Phe Asp Ala Lys Ile 760 765 770	2359
aat aat gag aac atg acc aag tgc ctg cag agc ctg aag gag atg tac Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln Ser Leu Lys Glu Met Tyr 775 780 785 790	2407
cag gac ctg aga aac aag ggt gtc ttc tgt gcc agc gaa gcg gag ttc Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys Ala Ser Glu Ala Glu Phe 795 800 805	2455
cag ggc tac aat gtt ctg ctc agt ctc aac aag gga gac atc cta aga Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn Lys Gly Asp Ile Leu Arg 810 815 820	2503
gaa gta caa cag ttc cat cct gct gtt aga aac tca tct gag gtg aaa Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg Asn Ser Ser Glu Val Lys 825 830 835	2551
ttt gct gtt cag gct ttt gct gca ttg aac agt aat aat ttt gtg aga Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn Ser Asn Asn Phe Val Arg 840 845 850	2599
ttt ttc aaa ctg gtc cag tca gct tct tac ctg aac gct tgt ctt tta	2647

Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr Leu Asn Ala Cys Leu Leu			
855	860	865	870
cac tgt tac ttc agt cag atc cgc aag gat gct ctc cg _g gc _g ct _c aac			2695
His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp Ala Leu Arg Ala Leu Asn			
875	880	885	
ttt gc _g tac acg gt _g agc aca cag cg _a tct acc atc ttt ccc ct _g gat			2743
Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser Thr Ile Phe Pro Leu Asp			
890	895	900	
gg _t gt _g gt _g cg _c at _g ct _g ct _g ttc aga gac tgt gaa gag gc _c acc gac			2791
Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp Cys Glu Glu Ala Thr Asp			
905	910	915	
ttc ctc acc tgc cac gg _c ctc acc gtt tcc gac gg _c tgt gt _g gag ct _g			2839
Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser Asp Gly Cys Val Glu Leu			
920	925	930	
aac cg _g tct gca ttc ct _g gaa cca gag gg _a tt _a tcc aag acc agg aag			2887
Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly Leu Ser Lys Thr Arg Lys			
935	940	945	950
tc _g gt _g ttt att act agg aag ct _g ac _g gt _g tca gt _c ggg gaa att gt _g			2935
Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val Ser Val Gly Glu Ile Val			
955	960	965	
aac gga ggg cca tt _g ccc ccc gt _c cct cgt cac acc cct gt _g tgc agc			2983
Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg His Thr Pro Val Cys Ser			
970	975	980	
ttc aac tcc cag aac aag tac atc ggg gag agc ct _g gc _c gc _g gag ct _g			3031
Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu Ser Leu Ala Ala Glu Leu			
985	990	995	
ccc gtc agc acc cag aga ccc gg _c tcc gac aca gt _g gg _c gga ggg			3076
Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp Thr Val Gly Gly Gly			
1000	1005	1010	
aga gga gag gag tgt gta gag cc _g gat gca ccc ct _g tcc agt			3121
Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp Ala Pro Leu Ser Ser			
1015	1020	1025	
ctc cca cag tct cta cca gc _c cct gc _g ccc tca cca gt _g cct ct _g			3166
Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro Ser Pro Val Pro Leu			
1030	1035	1040	
cct cct gtc ct _g gca ct _g acc cc _g tct gt _g gc _g ccc agc ctc tt _c			3211
Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val Ala Pro Ser Leu Phe			
1045	1050	1055	

cag	ctg	tct	gtg	cag	cct	gaa	cca	ccg	cct	cca	gag	ccc	gtg	ccc		3256
Gln	Leu	Ser	Val	Gln	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Val	Pro		
1060					1065						1070					
atg	tac	tct	gac	gag	gac	ctg	gcg	cag	gtg	gtg	gac	gag	ctc	atc		3301
Met	Tyr	Ser	Asp	Glu	Asp	Leu	Ala	Gln	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Ile		
1075						1080					1085					
cag	gag	gcc	ctg	cag	agg	gac	tgt	gag	gaa	gtt	ggc	tct	gcg	ggt		3346
Gln	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Asp	Cys	Glu	Glu	Val	Gly	Ser	Ala	Gly		
1090						1095					1100					
gct	gcc	tac	gca	gct	gcc	gcc	ctg	ggt	gtt	tct	aat	gct	gct	atg		3391
Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Val	Ser	Asn	Ala	Ala	Met		
1105						1110					1115					
gag	gat	ttg	tta	aca	gct	gca	acc	acg	ggc	att	ttg	agg	cac	att		3436
Glu	Asp	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Gly	Ile	Leu	Arg	His	Ile		
1120						1125					1130					
gca	gct	gaa	gaa	gtg	tct	aag	gaa	aga	gag	cga	agg	gag	cag	gag		3481
Ala	Ala	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Arg	Glu	Gln	Glu		
1135						1140					1145					
agg	cag	cgg	gct	gaa	gag	gaa	agg	ttg	aaa	caa	gag	aga	gag	ctg		3526
Arg	Gln	Arg	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Gln	Glu	Arg	Glu	Leu		
1150						1155					1160					
gtg	tta	agt	gag	ctg	agc	cag	ggc	ctg	gcc	gtg	gag	ctg	atg	gaa		3571
Val	Leu	Ser	Glu	Leu	Ser	Gln	Gly	Leu	Ala	Val	Glu	Leu	Met	Glu		
1165						1170					1175					
cgc	gtg	atg	atg	gag	ttt	gtg	agg	gaa	acc	tgc	tcc	cag	gag	ttg		3616
Arg	Val	Met	Met	Glu	Phe	Val	Arg	Glu	Thr	Cys	Ser	Gln	Glu	Leu		
1180						1185					1190					
aag	aat	gca	gta	gag	aca	gac	cag	agg	gtc	cgt	gtg	gcc	cgt	tgc		3661
Lys	Asn	Ala	Val	Glu	Thr	Asp	Gln	Arg	Val	Arg	Val	Ala	Arg	Cys		
1195						1200					1205					
tgt	gag	gat	gtc	tgt	gcc	cac	tta	gtg	gac	ttg	ttt	ctc	gtg	gag		3706
Cys	Glu	Asp	Val	Cys	Ala	His	Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Leu	Val	Glu		
1210						1215					1220					
gaa	atc	ttc	cag	act	gca	aag	gag	acc	ctc	cag	gag	ctt	cag	tgc		3751
Glu	Ile	Phe	Gln	Thr	Ala	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln	Cys		
1225						1230					1235					
ttc	tgc	aag	tat	cta	cag	cgg	tgg	agg	gaa	gct	gtc	aca	gcc	cgc		3796

Phe	Cys	Lys	Tyr	Leu	Gln	Arg	Trp	Arg	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Arg	
1240				1245					1250						
aag	aaa	ctg	agg	cgc	caa	atg	cgg	gct	ttc	cct	gct	gcg	ccc	tgc	3841
Lys	Lys	Leu	Arg	Arg	Gln	Met	Arg	Ala	Phe	Pro	Ala	Ala	Pro	Cys	
1255					1260					1265					
tgc	gtg	gac	gtg	agc	gac	cgg	ctg	agg	gcg	ctg	gcg	ccc	agc	gca	3886
Cys	Val	Asp	Val	Ser	Asp	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Pro	Ser	Ala	
1270					1275					1280					
gag	tgc	ccc	att	gct	gaa	gag	aac	ctg	gcc	agg	ggc	ctc	ctg	gac	3931
Glu	Cys	Pro	Ile	Ala	Glu	Glu	Asn	Leu	Ala	Arg	Gly	Leu	Leu	Asp	
1285					1290					1295					
ctg	ggc	cat	gca	ggg	aga	ttg	ggc	atc	tct	tgc	acc	agg	tta	agg	3976
Leu	Gly	His	Ala	Gly	Arg	Leu	Gly	Ile	Ser	Cys	Thr	Arg	Leu	Arg	
1300					1305					1310					
cgg	ctc	aga	aac	aag	aca	gct	cac	cag	atg	aag	gtt	cag	cac	tcc	4021
Arg	Leu	Arg	Asn	Lys	Thr	Ala	His	Gln	Met	Lys	Val	Gln	His	Phe	
1315					1320					1325					
tac	cag	cag	ctg	ctg	agt	gat	gtg	gca	tgg	gcg	tct	ctg	gac	ctg	4066
Tyr	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Val	Ala	Trp	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	
1330					1335					1340					
cca	tcc	ctc	gtg	gct	gag	cac	ctc	cct	ggg	agg	cag	gag	cat	gtg	4111
Pro	Ser	Leu	Val	Ala	Glu	His	Leu	Pro	Gly	Arg	Gln	Glu	His	Val	
1345					1350					1355					
ttt	tgg	aag	ctg	gtg	ctg	gtg	ttg	ccg	gat	gta	gag	gag	cag	tcc	4156
Phe	Trp	Lys	Leu	Val	Leu	Val	Leu	Pro	Asp	Val	Glu	Glu	Gln	Ser	
1360					1365					1370					
cca	gag	agt	tgt	ggc	aga	att	cta	gca	aat	tgg	tta	aaa	gtc	aag	4201
Pro	Glu	Ser	Cys	Gly	Arg	Ile	Leu	Ala	Asn	Trp	Leu	Lys	Val	Lys	
1375					1380					1385					
ttc	atg	gga	gat	gaa	ggc	tca	gtg	gat	gac	aca	tcc	agc	gat	gct	4246
Phe	Met	Gly	Asp	Glu	Gly	Ser	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Ser	Asp	Ala	
1390					1395					1400					
ggt	ggg	att	cag	acg	ctt	tcg	ctt	ttc	aac	tca	ctt	agc	agc	aaa	4291
Gly	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Phe	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Lys	
1405					1410					1415					
ggg	gat	cag	atg	att	tct	gtt	aac	gtg	tgt	ata	aag	gtg	gcc	cat	4336
Gly	Asp	Gln	Met	Ile	Ser	Val	Asn	Val	Cys	Ile	Lys	Val	Ala	His	
1420					1425					1430					

ggc	gcc	ctc	agt	gat	ggt	gcc	att	gat	gct	gtg	gag	aca	cag	aag	4381
Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Gly	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Glu	Thr	Gln	Lys	
1435							1440				1445				
gac	ctc	ctg	gga	gcc	agt	ggg	ctc	atg	ctg	ctg	ctt	ccc	ccc	aaa	4426
Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Leu	Met	Leu	Leu	Leu	Pro	Pro	Lys	
1450							1455				1460				
atg	aag	agt	gag	gac	atg	gca	gag	gag	gac	gtg	tac	tgg	ctg	tcg	4471
Met	Lys	Ser	Glu	Asp	Met	Ala	Glu	Glu	Asp	Val	Tyr	Trp	Leu	Ser	
1465							1470				1475				
gcc	ttg	ctg	cag	ctc	aag	cag	ctc	ctg	cag	gct	aag	ccc	ttc	cag	4516
Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Pro	Phe	Gln	
1480							1485				1490				
cct	gcg	ctt	cct	ctg	gtg	gtt	ctt	gtg	cct	agc	cca	gga	ggg	gac	4561
Pro	Ala	Leu	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Val	Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Asp	
1495							1500				1505				
gcc	gtt	gag	aag	gaa	gta	gaa	gat	ggt	ctg	atg	cta	cag	gac	ttg	4606
Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Val	Glu	Asp	Gly	Leu	Met	Leu	Gln	Asp	Leu	
1510							1515				1520				
gtt	tca	gct	aag	ctg	att	tca	gat	tac	act	gtt	acc	gag	atc	cct	4651
Val	Ser	Ala	Lys	Leu	Ile	Ser	Asp	Tyr	Thr	Val	Thr	Glu	Ile	Pro	
1525							1530				1535				
gat	acc	att	aat	gat	cta	caa	ggt	tca	act	aag	gtt	ttg	caa	gca	4696
Asp	Thr	Ile	Asn	Asp	Leu	Gln	Gly	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Gln	Ala	
1540							1545				1550				
gtg	cag	tgg	ctg	gtt	tcc	cac	tgc	ccc	cat	tcc	ctt	gac	ctc	tcg	4741
Val	Gln	Trp	Leu	Val	Ser	His	Cys	Pro	His	Ser	Leu	Asp	Leu	Cys	
1555							1560				1565				
tgc	cag	act	ctc	att	cag	tac	gtc	gaa	gac	ggg	att	ggc	cat	gag	4786
Cys	Gln	Thr	Leu	Ile	Gln	Tyr	Val	Glu	Asp	Gly	Ile	Gly	His	Glu	
1570							1575				1580				
ttt	agt	ggc	cgc	ttt	ttc	cat	gac	aga	aga	gag	agg	cgt	ctg	ggc	4831
Phe	Ser	Gly	Arg	Phe	Phe	His	Asp	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Leu	Gly	
1585							1590				1595				
ggt	ctt	gct	tct	cag	gag	cct	ggc	gcc	atc	att	gag	ctg	ttt	aac	4876
Gly	Leu	Ala	Ser	Gln	Glu	Pro	Gly	Ala	Ile	Ile	Glu	Leu	Phe	Asn	
1600							1605				1610				
agt	gtg	ctg	cag	ttc	ctg	gct	tct	gtg	gtg	tcc	tct	gaa	cag	ctg	4921

Ser	Val	Leu	Gln	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	
1615				1620						1625					
tgt	gac	ctg	tcc	tgg	cct	gtc	act	gag	ttt	gct	gag	gca	ggg	ggc	4966
Cys	Asp	Leu	Ser	Trp	Pro	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Glu	Ala	Gly	Gly	
1630					1635						1640				
agc	cgg	ctg	ctt	cct	cac	ctg	cac	tgg	aat	gcc	cca	gag	cac	ctg	5011
Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	His	Leu	His	Trp	Asn	Ala	Pro	Glu	His	Leu	
1645						1650					1655				
gcc	tgg	ctg	aag	cag	gct	gtg	ctc	ggg	ttc	cag	ctt	ccg	cag	atg	5056
Ala	Trp	Leu	Lys	Gln	Ala	Val	Leu	Gly	Phe	Gln	Leu	Pro	Gln	Met	
1660						1665					1670				
gac	ctt	cca	ccc	ctg	ggg	gcc	ccc	tgg	ctc	ccc	gtg	tgc	tcc	atg	5101
Asp	Leu	Pro	Pro	Leu	Gly	Ala	Pro	Trp	Leu	Pro	Val	Cys	Ser	Met	
1675						1680					1685				
gtt	gtc	cag	tac	gcc	tcc	cag	atc	ccc	agc	tca	cgc	cag	aca	cag	5146
Val	Val	Gln	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ile	Pro	Ser	Ser	Arg	Gln	Thr	Gln	
1690						1695					1700				
cct	gtc	ctc	cag	tcc	cag	gtg	gag	aac	ctg	ctc	cac	aga	acc	tac	5191
Pro	Val	Leu	Gln	Ser	Gln	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	His	Arg	Thr	Tyr	
1705						1710					1715				
tgt	agg	tgg	aag	agc	aag	agt	ccc	tcc	cca	gtc	cat	ggg	gca	ggc	5236
Cys	Arg	Trp	Lys	Ser	Lys	Ser	Pro	Ser	Pro	Val	His	Gly	Ala	Gly	
1720						1725					1730				
ccc	tcg	gtc	atg	gag	atc	cca	tgg	gat	gat	ctt	atc	gcc	ttg	tgt	5281
Pro	Ser	Val	Met	Glu	Ile	Pro	Trp	Asp	Asp	Leu	Ile	Ala	Leu	Cys	
1735						1740					1745				
atc	aac	cac	aag	ctg	aga	gac	tgg	acg	ccc	ccc	cgg	ctt	cct	gtt	5326
Ile	Asn	His	Lys	Leu	Arg	Asp	Trp	Thr	Pro	Pro	Arg	Leu	Pro	Val	
1750						1755					1760				
aca	tca	gag	gcg	ctg	agt	gaa	gat	ggt	cag	ata	tgt	gtg	tat	ttt	5371
Thr	Ser	Glu	Ala	Leu	Ser	Glu	Asp	Gly	Gln	Ile	Cys	Val	Tyr	Phe	
1765						1770					1775				
ttt	aaa	aac	gat	ttg	aaa	aaa	tat	gat	gtt	cct	ttg	tcg	tgg	gaa	5416
Phe	Lys	Asn	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr	Asp	Val	Pro	Leu	Ser	Trp	Gl	
1780						1785					1790				
caa	gcc	agg	ttg	cag	acg	cag	aag	gag	cta	cag	ctg	aga	gag	gga	5461
Gln	Ala	Arg	Leu	Gln	Thr	Gln	Lys	Glu	Leu	Gln	Leu	Arg	Glu	Gly	
1795						1800					1805				

cgt ttg gca ata aag cct ttt	cat cct tct gca aac	aat ttt ccc	5506
Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe	His Pro Ser Ala Asn	Asn Phe Pro	
1810	1815	1820	
ata cca ttg ctt cac atg cac	cgt aac tgg aag agg	agc aca gag	5551
Ile Pro Leu Leu His Met His	Arg Asn Trp Lys Arg	Ser Thr Glu	
1825	1830	1835	
tgt gct caa gag ggg agg att	ccc agc aca gag gat	ctg atg cga	5596
Cys Ala Gln Glu Gly Arg Ile	Pro Ser Thr Glu Asp	Leu Met Arg	
1840	1845	1850	
gga gct tct gct gag gag ctc	ttg gcg cag tgt ttg	tcg agc agt	5641
Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu	Leu Ala Gln Cys Leu	Ser Ser Ser	
1855	1860	1865	
ctg ctg ctg gag aaa gaa gag	aac aag agg ttt gaa	gat cag ctt	5686
Leu Leu Leu Glu Lys Glu Glu	Asn Lys Arg Phe Glu	Asp Gln Leu	
1870	1875	1880	
cag caa tgg ttg tct gaa gac	tca gga gca ttt acg	gat tta act	5731
Gln Gln Trp Leu Ser Glu Asp	Ser Gly Ala Phe Thr	Asp Leu Thr	
1885	1890	1895	
tcc ctt ccc ctc tat ctt cct	cag act cta gtg tct	ctt tct cac	5776
Ser Leu Pro Leu Tyr Leu Pro	Gln Thr Leu Val Ser	Leu Ser His	
1900	1905	1910	
act att gaa cct gtg atg aaa	aca tct gta act act	agc cca cag	5821
Thr Ile Glu Pro Val Met Lys	Thr Ser Val Thr Thr	Ser Pro Gln	
1915	1920	1925	
agt gac atg atg agg gag caa	ctg cag ctg tca gag	gcg aca gga	5866
Ser Asp Met Met Arg Glu Gln	Leu Gln Leu Ser Glu	Ala Thr Gly	
1930	1935	1940	
acg tgt cta ggc gaa cga cta	aag cac ctg gaa agg	ctg atc cg	5911
Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu	Lys His Leu Glu Arg	Leu Ile Arg	
1945	1950	1955	
agt tca agg gaa gag gaa gtt	gcc tct gag ctc cat	ctc tct gcg	5956
Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val	Ala Ser Glu Leu His	Leu Ser Ala	
1960	1965	1970	
ctg cta gac atg gtg gac att	tgagcagcct gacctgtggg gaggggtct		6007
Leu Leu Asp Met Val Asp Ile			
1975	1980		
ctccccaaga gtttctgttt ttactcaaaa taatgttatt ctcagatgct tgatgcactg			6067

ttggaaatgt gattaattta atcatgcaga taaaccattt aaatgtc 6114

<210> 4

<211> 1980

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Pro Thr Asn Pro Phe Ser Gly Gln Gln Pro Ser Ala Phe Ser
1 5 10 15

Ala Ser Ser Ser Asn Val Gly Thr Leu Pro Ser Lys Pro Pro Phe Arg
20 25 30

Phe Gly Gln Pro Ser Leu Phe Gly Gln Asn Ser Thr Leu Ser Gly Lys
35 40 45

Ser Ser Gly Phe Ser Gln Val Ser Ser Phe Pro Ala Ser Ser Gly Val
50 55 60

Ser His Ser Ser Ser Val Gln Thr Leu Gly Phe Thr Gln Thr Ser Ser
65 70 75 80

Val Gly Pro Phe Ser Gly Leu Glu His Thr Ser Thr Phe Val Ala Thr
85 90 95

Ser Gly Pro Ser Ser Ser Val Leu Gly Asn Thr Gly Phe Ser Phe
100 105 110

Lys Ser Pro Thr Ser Val Gly Ala Phe Pro Ser Thr Ser Ala Phe Gly
115 120 125

Gln Glu Ala Gly Glu Ile Val Asn Ser Gly Phe Gly Lys Thr Glu Phe
130 135 140

Ser Phe Lys Pro Leu Glu Asn Ala Val Phe Lys Pro Ile Leu Gly Ala
145 150 155 160

Glu Ser Glu Pro Glu Lys Thr Gln Ser Gln Ile Ala Ser Gly Phe Phe
165 170 175

Thr Phe Ser His Pro Ile Ser Ser Ala Pro Gly Gly Leu Ala Pro Phe
180 185 190

Ser Phe Pro Gln Val Thr Ser Ser Ala Thr Thr Ser Asn Phe Thr
195 200 205

Phe Ser Lys Pro Val Ser Ser Asn Asn Ser Leu Ser Ala Phe Thr Pro
210 215 220

Ala Leu Ser Asn Gln Asn Val Glu Glu Glu Lys Arg Gly Pro Lys Ser
225 230 235 240

Ile Phe Gly Ser Ser Asn Asn Ser Phe Ser Ser Phe Pro Val Ser Ser
245 250 255

Ala Val Leu Gly Glu Pro Phe Gln Ala Ser Lys Ala Gly Val Arg Gln
260 265 270

Gly Cys Glu Glu Ala Val Ser Gln Val Glu Pro Leu Pro Ser Leu Met
275 280 285

Lys Gly Leu Lys Arg Lys Glu Asp Gln Asp Arg Ser Pro Arg Arg His
290 295 300

Gly His Glu Pro Ala Glu Asp Ser Asp Pro Leu Ser Arg Gly Asp His
305 310 315 320

Pro Pro Asp Lys Arg Pro Val Arg Leu Asn Arg Pro Arg Gly Gly Thr
325 330 335

Leu Phe Gly Arg Thr Ile Gln Asp Val Phe Lys Ser Asn Lys Glu Val
340 345 350

Gly Arg Leu Gly Asn Lys Glu Ala Lys Lys Glu Thr Gly Phe Val Glu

355

360

365

Ser Ala Glu Ser Asp His Met Ala Ile Pro Gly Gly Asn Gln Ser Val
 370 375 380

Leu Ala Pro Ser Arg Ile Pro Gly Val Asn Lys Glu Glu Glu Thr Glu
 385 390 395 400

Ser Arg Glu Lys Lys Glu Asp Ser Leu Arg Gly Thr Pro Ala Arg Gln
 405 . 410 415

Ser Asn Arg Ser Glu Ser Thr Asp Ser Leu Gly Gly Leu Ser Pro Ser
 420 425 430

Glu Val Thr Ala Ile Gln Cys Lys Asn Ile Pro Asp Tyr Leu Asn Asp
 435 440 445

Arg Thr Ile Leu Glu Asn His Phe Gly Lys Ile Ala Lys Val Gln Arg
 450 455 460

Ile Phe Thr Arg Arg Ser Lys Lys Leu Ala Val Val His Phe Phe Asp
 465 470 475 480

His Ala Ser Ala Ala Leu Ala Arg Lys Lys Gly Lys Ser Leu His Lys
 485 490 495

Asp Met Ala Ile Phe Trp His Arg Lys Lys Ile Ser Pro Asn Lys Lys
 500 505 510

Pro Phe Ser Leu Lys Glu Lys Lys Pro Gly Asp Gly Glu Val Ser Pro
 515 520 525

Ser Thr Glu Asp Ala Pro Phe Gln His Ser Pro Leu Gly Lys Ala Ala
 530 535 540

Gly Arg Thr Gly Ala Ser Ser Leu Leu Asn Lys Ser Ser Pro Val Lys
 545 550 555 560

Lys Pro Ser Leu Leu Lys Ala His Gln Phe Glu Gly Asp Ser Phe Asp
 565 570 575

Ser Ala Ser Glu Gly Ser Glu Gly Leu Gly Pro Cys Val Leu Ser Leu
 580 585 590

Ser Thr Leu Ile Gly Thr Val Ala Glu Thr Ser Lys Glu Lys Tyr Arg
 595 600 605

Leu Leu Asp Gln Arg Asp Arg Ile Met Arg Gln Ala Arg Val Lys Arg
 610 615 620

Thr Asp Leu Asp Lys Ala Arg Thr Phe Val Gly Thr Cys Leu Asp Met
 625 630 635 640

Cys Pro Glu Lys Glu Arg Tyr Met Arg Glu Thr Arg Ser Gln Leu Ser
 645 650 655

Val Phe Glu Val Val Pro Gly Thr Asp Gln Val Asp His Ala Ala Ala
 660 665 670

Val Lys Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Ala Asp Gln Glu Glu Pro Leu Pro
 675 680 685

His Glu Leu Arg Pro Leu Pro Val Leu Ser Arg Thr Met Asp Tyr Leu
 690 695 700

Val Thr Gln Ile Met Asp Gln Lys Glu Gly Ser Leu Arg Asp Trp Tyr
 705 710 715 720

Asp Phe Val Trp Asn Arg Thr Arg Gly Ile Arg Lys Asp Ile Thr Gln
 725 730 735

Gln His Leu Cys Asp Pro Leu Thr Val Ser Leu Ile Glu Lys Cys Thr
 740 745 750

Arg Phe His Ile His Cys Ala His Phe Met Cys Glu Glu Pro Met Ser

755

760

765

Ser Phe Asp Ala Lys Ile Asn Asn Glu Asn Met Thr Lys Cys Leu Gln
 770 775 780

Ser Leu Lys Glu Met Tyr Gln Asp Leu Arg Asn Lys Gly Val Phe Cys
 785 790 795 800

Ala Ser Glu Ala Glu Phe Gln Gly Tyr Asn Val Leu Leu Ser Leu Asn
 805 810 815

Lys Gly Asp Ile Leu Arg Glu Val Gln Gln Phe His Pro Ala Val Arg
 820 825 830

Asn Ser Ser Glu Val Lys Phe Ala Val Gln Ala Phe Ala Ala Leu Asn
 835 840 845

Ser Asn Asn Phe Val Arg Phe Phe Lys Leu Val Gln Ser Ala Ser Tyr
 850 855 860

Leu Asn Ala Cys Leu Leu His Cys Tyr Phe Ser Gln Ile Arg Lys Asp
 865 870 875 880

Ala Leu Arg Ala Leu Asn Phe Ala Tyr Thr Val Ser Thr Gln Arg Ser
 885 890 895

Thr Ile Phe Pro Leu Asp Gly Val Val Arg Met Leu Leu Phe Arg Asp
 900 905 910

Cys Glu Glu Ala Thr Asp Phe Leu Thr Cys His Gly Leu Thr Val Ser
 915 920 925

Asp Gly Cys Val Glu Leu Asn Arg Ser Ala Phe Leu Glu Pro Glu Gly
 930 935 940

Leu Ser Lys Thr Arg Lys Ser Val Phe Ile Thr Arg Lys Leu Thr Val
 945 950 955 960

Ser Val Gly Glu Ile Val Asn Gly Gly Pro Leu Pro Pro Val Pro Arg
965 970 975

His Thr Pro Val Cys Ser Phe Asn Ser Gln Asn Lys Tyr Ile Gly Glu
980 985 990

Ser Leu Ala Ala Glu Leu Pro Val Ser Thr Gln Arg Pro Gly Ser Asp
995 1000 1005

Thr Val Gly Gly Gly Arg Gly Glu Glu Cys Gly Val Glu Pro Asp
1010 1015 1020

Ala Pro Leu Ser Ser Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ala Pro Ala Pro
1025 1030 1035

Ser Pro Val Pro Leu Pro Pro Val Leu Ala Leu Thr Pro Ser Val
1040 1045 1050

Ala Pro Ser Leu Phe Gln Leu Ser Val Gln Pro Glu Pro Pro Pro
1055 1060 1065

Pro Glu Pro Val Pro Met Tyr Ser Asp Glu Asp Leu Ala Gln Val
1070 1075 1080

Val Asp Glu Leu Ile Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Cys Glu Glu
1085 1090 1095

Val Gly Ser Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Leu Gly Val
1100 1105 1110

Ser Asn Ala Ala Met Glu Asp Leu Leu Thr Ala Ala Thr Thr Gly
1115 1120 1125

Ile Leu Arg His Ile Ala Ala Glu Glu Val Ser Lys Glu Arg Glu
1130 1135 1140

Arg Arg Glu Gln Glu Arg Gln Arg Ala Glu Glu Glu Arg Leu Lys

1145

1150

1155

Gln Glu Arg Glu Leu Val Leu Ser Glu Leu Ser Gln Gly Leu Ala
 1160 1165 1170

Val Glu Leu Met Glu Arg Val Met Met Glu Phe Val Arg Glu Thr
 1175 1180 1185

Cys Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ala Val Glu Thr Asp Gln Arg Val
 1190 1195 1200

Arg Val Ala Arg Cys Cys Glu Asp Val Cys Ala His Leu Val Asp
 1205 1210 1215

Leu Phe Leu Val Glu Glu Ile Phe Gln Thr Ala Lys Glu Thr Leu
 1220 1225 1230

Gln Glu Leu Gln Cys Phe Cys Lys Tyr Leu Gln Arg Trp Arg Glu
 1235 1240 1245

Ala Val Thr Ala Arg Lys Lys Leu Arg Arg Gln Met Arg Ala Phe
 1250 1255 1260

Pro Ala Ala Pro Cys Cys Val Asp Val Ser Asp Arg Leu Arg Ala
 1265 1270 1275

Leu Ala Pro Ser Ala Glu Cys Pro Ile Ala Glu Glu Asn Leu Ala
 1280 1285 1290

Arg Gly Leu Leu Asp Leu Gly His Ala Gly Arg Leu Gly Ile Ser
 1295 1300 1305

Cys Thr Arg Leu Arg Arg Leu Arg Asn Lys Thr Ala His Gln Met
 1310 1315 1320

Lys Val Gln His Phe Tyr Gln Gln Leu Leu Ser Asp Val Ala Trp
 1325 1330 1335

Ala Ser Leu Asp Leu Pro Ser Leu Val Ala Glu His Leu Pro Gly
1340 1345 1350

Arg Gln Glu His Val Phe Trp Lys Leu Val Leu Val Leu Pro Asp
1355 1360 1365

Val Glu Glu Gln Ser Pro Glu Ser Cys Gly Arg Ile Leu Ala Asn
1370 1375 1380

Trp Leu Lys Val Lys Phe Met Gly Asp Glu Gly Ser Val Asp Asp
1385 1390 1395

Thr Ser Ser Asp Ala Gly Gly Ile Gln Thr Leu Ser Leu Phe Asn
1400 1405 1410

Ser Leu Ser Ser Lys Gly Asp Gln Met Ile Ser Val Asn Val Cys
1415 1420 1425

Ile Lys Val Ala His Gly Ala Leu Ser Asp Gly Ala Ile Asp Ala
1430 1435 1440

Val Glu Thr Gln Lys Asp Leu Leu Gly Ala Ser Gly Leu Met Leu
1445 1450 1455

Leu Leu Pro Pro Lys Met Lys Ser Glu Asp Met Ala Glu Glu Asp
1460 1465 1470

Val Tyr Trp Leu Ser Ala Leu Leu Gln Leu Lys Gln Leu Leu Gln
1475 1480 1485

Ala Lys Pro Phe Gln Pro Ala Leu Pro Leu Val Val Leu Val Pro
1490 1495 1500

Ser Pro Gly Gly Asp Ala Val Glu Lys Glu Val Glu Asp Gly Leu
1505 1510 1515

Met Leu Gln Asp Leu Val Ser Ala Lys Leu Ile Ser Asp Tyr Thr

1520

1525

1530

Val Thr Glu Ile Pro Asp Thr Ile Asn Asp Leu Gln Gly Ser Thr
 1535 1540 1545

Lys Val Leu Gln Ala Val Gln Trp Leu Val Ser His Cys Pro His
 1550 1555 1560

Ser Leu Asp Leu Cys Cys Gln Thr Leu Ile Gln Tyr Val Glu Asp
 1565 1570 1575

Gly Ile Gly His Glu Phe Ser Gly Arg Phe Phe His Asp Arg Arg
 1580 1585 1590

Glu Arg Arg Leu Gly Gly Leu Ala Ser Gln Glu Pro Gly Ala Ile
 1595 1600 1605

Ile Glu Leu Phe Asn Ser Val Leu Gln Phe Leu Ala Ser Val Val
 1610 1615 1620

Ser Ser Glu Gln Leu Cys Asp Leu Ser Trp Pro Val Thr Glu Phe
 1625 1630 1635

Ala Glu Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Pro His Leu His Trp Asn
 1640 1645 1650

Ala Pro Glu His Leu Ala Trp Leu Lys Gln Ala Val Leu Gly Phe
 1655 1660 1665

Gln Leu Pro Gln Met Asp Leu Pro Pro Leu Gly Ala Pro Trp Leu
 1670 1675 1680

Pro Val Cys Ser Met Val Val Gln Tyr Ala Ser Gln Ile Pro Ser
 1685 1690 1695

Ser Arg Gln Thr Gln Pro Val Leu Gln Ser Gln Val Glu Asn Leu
 1700 1705 1710

Leu His Arg Thr Tyr Cys Arg Trp Lys Ser Lys Ser Pro Ser Pro
1715 1720 1725

Val His Gly Ala Gly Pro Ser Val Met Glu Ile Pro Trp Asp Asp
1730 1735 1740

Leu Ile Ala Leu Cys Ile Asn His Lys Leu Arg Asp Trp Thr Pro
1745 1750 1755

Pro Arg Leu Pro Val Thr Ser Glu Ala Leu Ser Glu Asp Gly Gln
1760 1765 1770

Ile Cys Val Tyr Phe Phe Lys Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Val
1775 1780 1785

Pro Leu Ser Trp Glu Gln Ala Arg Leu Gln Thr Gln Lys Glu Leu
1790 1795 1800

Gln Leu Arg Glu Gly Arg Leu Ala Ile Lys Pro Phe His Pro Ser
1805 1810 1815

Ala Asn Asn Phe Pro Ile Pro Leu Leu His Met His Arg Asn Trp
1820 1825 1830

Lys Arg Ser Thr Glu Cys Ala Gln Glu Gly Arg Ile Pro Ser Thr
1835 1840 1845

Glu Asp Leu Met Arg Gly Ala Ser Ala Glu Glu Leu Leu Ala Gln
1850 1855 1860

Cys Leu Ser Ser Ser Leu Leu Leu Glu Lys Glu Glu Asn Lys Arg
1865 1870 1875

Phe Glu Asp Gln Leu Gln Gln Trp Leu Ser Glu Asp Ser Gly Ala
1880 1885 1890

Phe Thr Asp Leu Thr Ser Leu Pro Leu Tyr Leu Pro Gln Thr Leu

1895

1900

1905

Val Ser Leu Ser His Thr Ile Glu Pro Val Met Lys Thr Ser Val
 1910 1915 1920

Thr Thr Ser Pro Gln Ser Asp Met Met Arg Glu Gln Leu Gln Leu
 1925 1930 1935

Ser Glu Ala Thr Gly Thr Cys Leu Gly Glu Arg Leu Lys His Leu
 1940 1945 1950

Glu Arg Leu Ile Arg Ser Ser Arg Glu Glu Glu Val Ala Ser Glu
 1955 1960 1965

Leu His Leu Ser Ala Leu Leu Asp Met Val Asp Ile
 1970 1975 1980

<210> 5

<211> 863

<212> PRT

<213> retroviral provirus

<400> 5

Lys Glu Gln Lys Thr Val Ala Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His
 1 5 10 15

Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu
 20 25 30

Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly
 35 40 45

Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp
 50 55 60

Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala
 65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val
 85 90 95

Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His
 100 105 110

Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys
 115 120 125

Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp
 130 135 140

Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu
 145 150 155 160

Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Ser Thr Ser Ile Arg Gly Lys Val
 165 170 175

Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr Lys Leu Asp Ile Ile Pro Ile Asp
 180 185 190

Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile
 195 200 205

Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr
 210 215 220

Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe
 225 230 235 240

Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His
 245 250 255

Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu
 260 265 270

Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Ala Asn Phe Thr Asp Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Gln Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr
 290 295 300

Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro
 305 310 315 320

Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala
 325 330 335

His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile
 340 345 350

Asp Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe
 355 360 365

Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn
 370 375 380

Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 385 390 395 400

Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr Lys Gly Ser Asn Asn Thr Glu
 405 410 415

Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn
 420 425 430

Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly
 435 440 445

Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp
 450 455 460

Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu Ser Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly
 465 470 475 480

Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val
485 490 495

Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val
500 505 510

Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly
515 520 525

Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu
530 535 540

Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn
545 550 555 560

Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr
565 570 575

Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg
580 585 590

Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys
595 600 605

Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys
610 615 620

Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg
625 630 635 640

Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser
645 650 655

Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys
660 665 670

Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr
675 680 685

Ile Lys Leu Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile
 690 695 700

Val Phe Ala Val Leu Ser Val Val Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser
 705 710 715 720

Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Ile Pro Arg Gly Pro Asp Arg
 725 730 735

Pro Glu Gly Ile Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser
 740 745 750

Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser Leu Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg
 755 760 765

Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile
 770 775 780

Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu
 785 790 795 800

Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn
 805 810 815

Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly
 820 825 830

Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg
 835 840 845

His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
 850 855 860

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> retroviral provirus

<400> 6

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala
1 5 10 15

Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile
20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

tcccgcccttc cagctgtgac 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 8

gtgctgctgt gttatgtcct 20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> retroviral provirus

<400> 9

Cys Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg
1 5 10 15

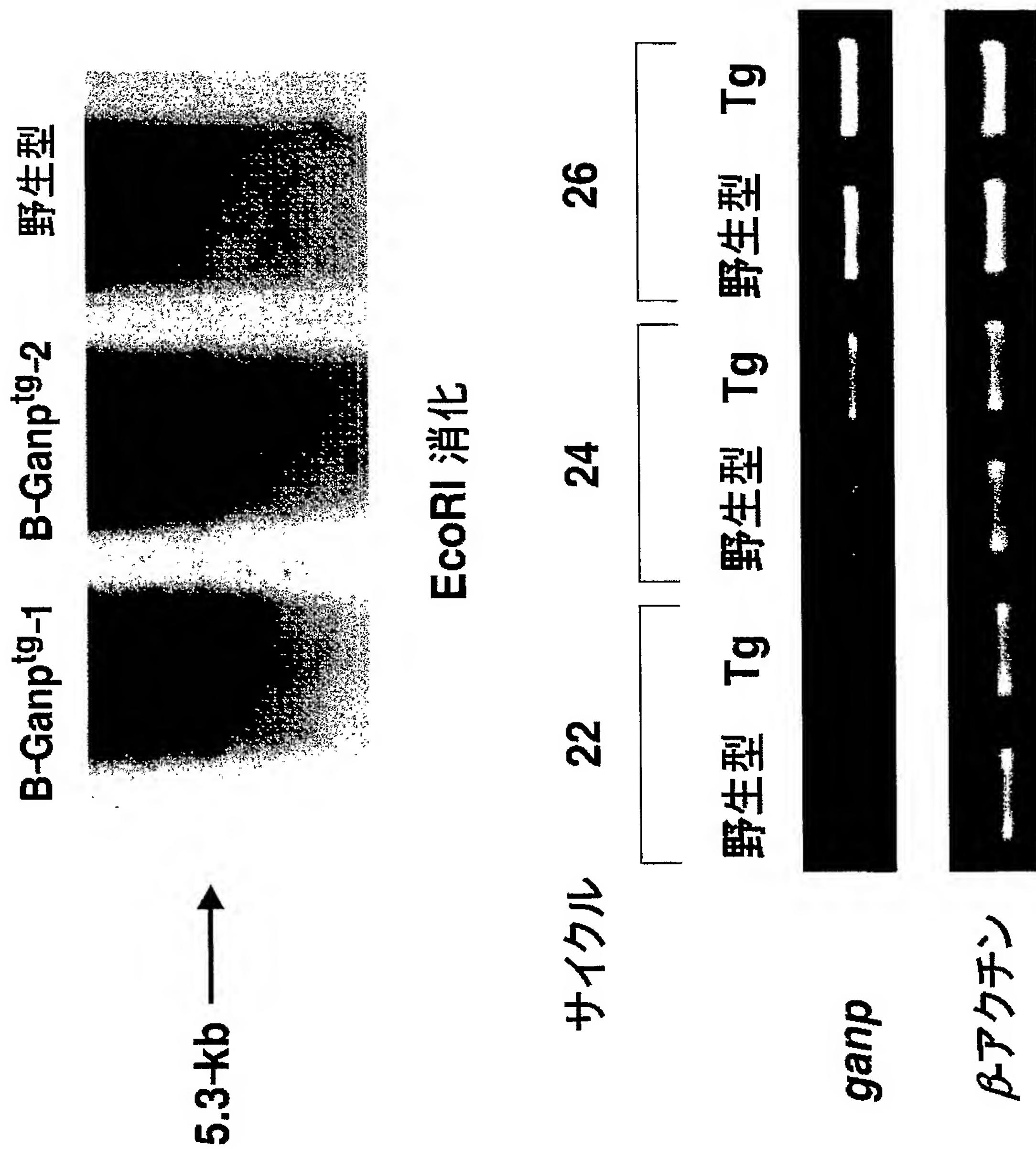
Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys Ile
20

特願2003-418655

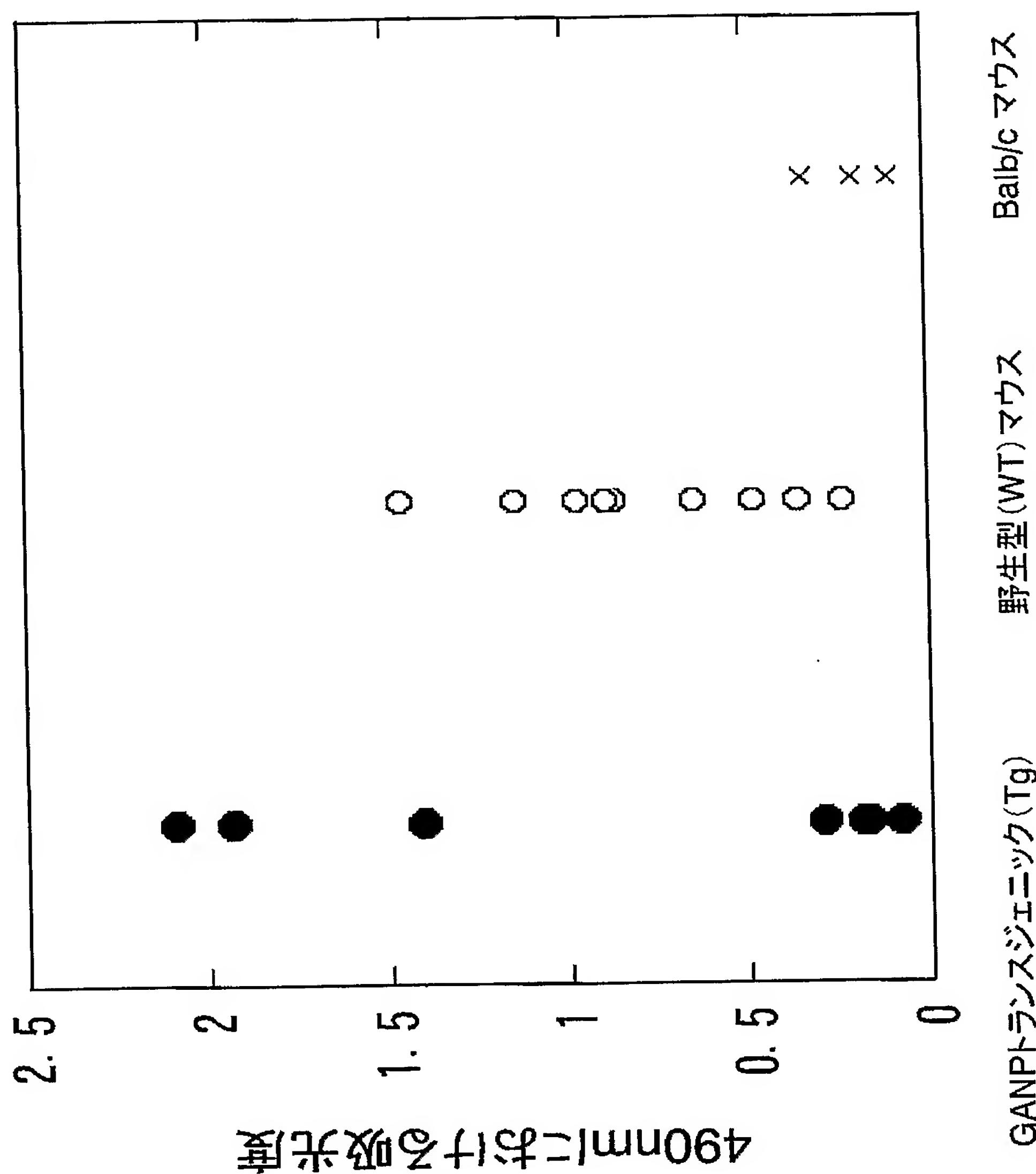
ページ： 49/E

出証特2004-3029373

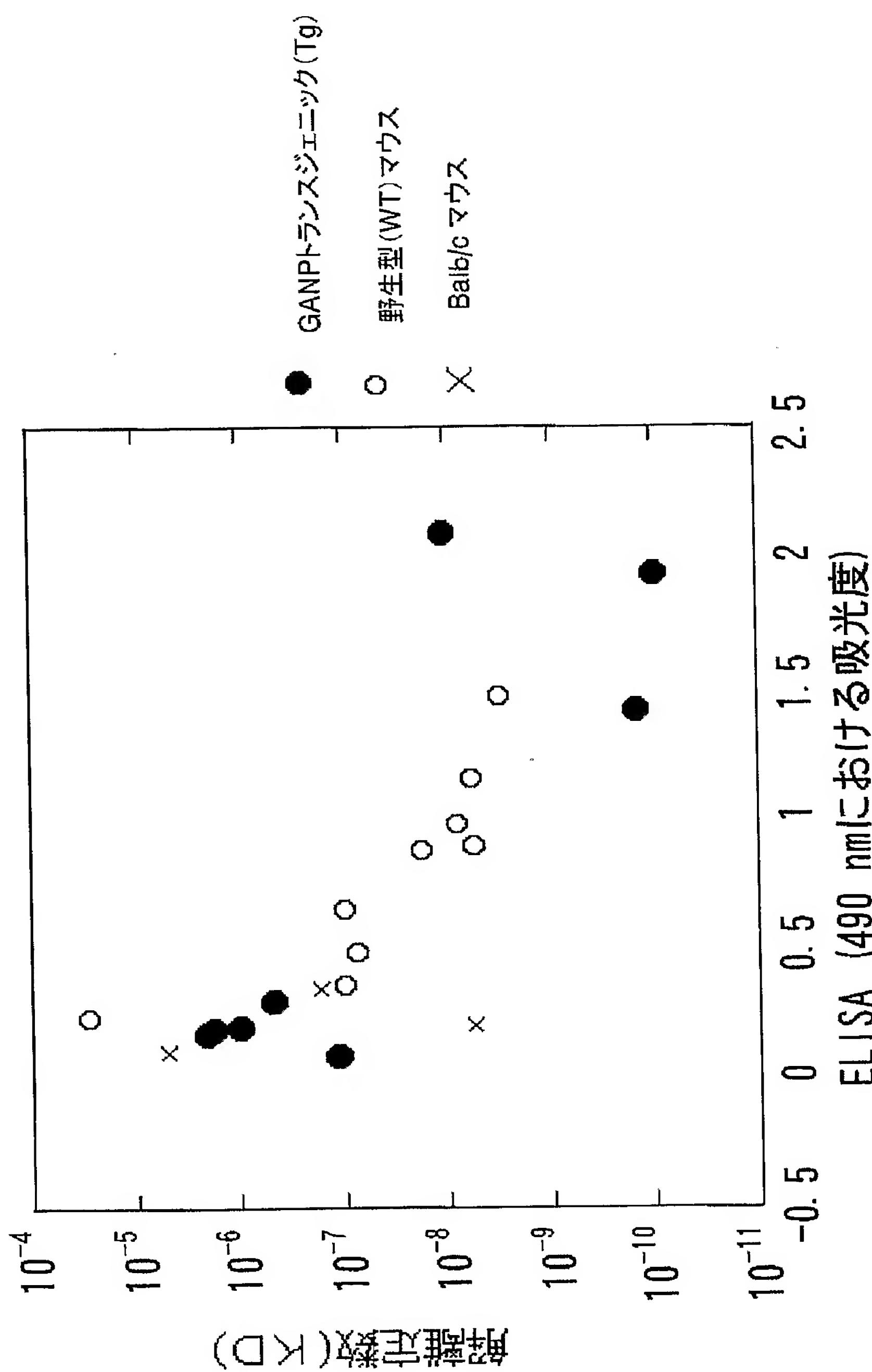
【書類名】 図面
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 高親和性抗HIV抗体の提供。

【解決手段】 HIVのgp120糖タンパク質と結合し、かつ、解離定数が $KD=1.0 \times 10^{-9}$ (M)以下の抗体又はその断片、前記抗体又はその断片を含有する医薬組成物、GAPNトランスジェニック動物又はその子孫を、配列番号6に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として免疫し、得られる動物又は子孫から抗体を採取することを特徴とする、抗HIV抗体又はその断片の製造方法。

【選択図】 なし

特願 2003-418655

出願人履歴情報

識別番号

[801000050]

1. 変更年月日

2001年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

熊本県上益城郡益城町大字田原 2081 番地 10

氏 名

財団法人くまもとテクノ産業財団